



Patrocínia do Carmo dos Santos Amendoeira

Licenciada em Biologia

**Estudo do efeito do pH na produção de
biohidrogénio por fermentação
anaeróbia no escuro (*dark
fermentation*) de casca de batata**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioenergia

Orientador: Professor Doutor Nuno Lapa, Professor
Auxiliar da FCT-UNL

Co-orientador: Doutor Paulo Lemos, Investigador
Principal da FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2018

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

**Estudo do efeito do pH na produção de biohidrogénio
por fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*) de casca de batata**

©Patrocínia do Carmo dos Santos Amendoeira

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Benilde Mendes, Professora Associada da FCT–UNL e Presidente do DCTB da FCT–UNL, pela amabilidade e disponibilidade demonstradas ao longo de todo o mestrado e por me ter possibilitado a realização desta dissertação no DCTB.

Ao meu orientador, Professor Doutor Nuno Lapa, Professor Auxiliar da FCT–UNL, pela orientação, disponibilidade, partilha de conhecimentos, motivação e entusiasmo com que me acompanhou em todas as etapas deste mestrado.

Ao meu co-orientador, Doutor Paulo Lemos, Investigador Principal da FCT–UNL, pela orientação, disponibilidade e rigor demonstrados.

Às Técnicas do laboratório do DCTB–FCT–UNL, pelo apoio prestado na realização das análises laboratoriais de azoto e fósforo.

Ao Doutor Nuno Costa, Técnico superior do laboratório de análises do DQ–FCT–UNL, pela realização das análises de GC-TCD.

Aos meus colegas de mestrado pelo companheirismo e solidariedade com que me brindaram durante todo o mestrado, em especial à Delfina Godinho e Vânia Mendes, por toda a amizade e apoio.

Um agradecimento muito especial ao meu companheiro André e à nossa filha Alice, por toda a paciência, apoio, incentivo e pelo carinho incondicional com que me acompanharam sempre durante esta laboriosa etapa, é a eles que dedico esta dissertação.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

RESUMO

A presente dissertação teve o propósito de estudar o efeito do pH (4, 6 e 7) na fermentação no escuro (*Dark fermentation*, DF) de casca de batata, para a produção de um fluxo de biogás rico em biohidrogénio (bioH_2).

Previamente à realização dos ensaios fermentativos, submeteu-se o resíduo a três pré-tratamentos: (i) trituração, até uma dimensão de partículas $<2\text{mm}$, (ii) autoclavagem a 122°C , $1,2\text{atm}$, durante 35min. , e (iii) alcalinização do resíduo autoclavado com NaOH (1N) até atingir um $\text{pH}=12$ e posterior aquecimento em banho de água, a 95°C , durante 30min. (A.30) e 60min. (A.60).

O pré-tratamento A.30 foi o escolhido para os ensaios de DF, pois resultou em valores de carência química de oxigénio solúvel (CQOs) próximos dos obtidos com o pré-tratamento A.60 ($18,3$ e $19,6\text{ g.L}^{-1}$, respetivamente), mas com menor consumo energético.

Utilizou-se um bio-reator completamente misturado, com alimentação sequencial e uma cultura mista proveniente de ensaios de digestão anaeróbia (metanogénica) com casca de batata, pré-tratado termicamente (90°C , durante 45min.). Em cada ensaio fez-se variar o pH ($\text{pH}=4$, ensaio E.4; $\text{pH}=6$, ensaio E.6; $\text{pH}=7$, ensaio E.7), mantendo-se constante o tempo de retenção hidráulico ($\text{TRH}=6\text{d}$), a carga orgânica aplicada (CA) no bio-reator ($10\text{ gCQOt.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e a temperatura (37°C).

Nos ensaios E.6 e E.7 não se detetou bioH_2 , mas foram quantificadas concentrações elevadas de CH_4 ($81,1$ – $83,6\%$ e $93,7$ – $97,8\%$ v/v, respetivamente).

O ensaio E.4 apresentou um biogás com teores consideráveis de bioH_2 ($30,0$ – $86,0\%$ v/v). Registaram-se caudais e rendimentos de produção de biogás e bioH_2 reduzidos ($34,8\text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $72,0\text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{SV}_{\text{removidos}}$).

Os resultados revelaram a ineficiência do pré-tratamento aplicado ao inóculo, pois não eliminou as bactérias metanogénicas. Contudo, o elevado teor de bioH_2 obtidos no ensaio E.4, permite antever que a casca de batata pode ser um substrato promissor para valorização energética através de DF.

Palavras-chaves: biohidrogénio; casca de batata; fermentação no escuro; resíduos; pré-tratamento.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

ABSTRACT

This work aimed to assess the effect of pH (4, 6 and 7) on the dark fermentation (DF) of potato peel waste for the production of a biogas flow rich in biohydrogen (bioH_2).

Previously to the fermentative assays, the waste was submitted to three pre-treatments: (i) grinding to a particle size $<2\text{mm}$, (ii) autoclaving at 122°C , 1.2atm , during 35min. , and (iii) alkalisation of the autoclaved waste with NaOH (1N), up to $\text{pH}=12$, and then water heating, at 95°C , during 30min. (A.30) and 60min. (A.60).

The pre-treatment A.30 was chosen for DF assays, because it resulted in a soluble chemical oxygen demand (CODs) close to the obtained with the pre-treatment A.60 (18.3 and 19.6 g.L^{-1} , respectively), but with lower energy consumption.

A completely mixed bio-reactor was used, with sequential feeding and a mixed culture, obtained from methanogenic anaerobic digestion of potato peel, thermally treated (90°C , during 45min.). In each assay, pH value was changed ($\text{pH}=4$, assay E.4; $\text{pH}=6$, assay E.6; $\text{pH}=7$, assay E.7), keeping constant the hydraulic retention time ($\text{HRT}=6\text{d}$), the organic loading rate (OLR) ($10\text{ gCQOt.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and temperature (37°C).

In the assays E.6 and E.7, no bioH_2 was detected, but high concentrations of CH_4 were quantified ($81.1\text{--}83.6\% \text{ v/v}$ e $93.7\text{--}97.8\% \text{ v/v}$, respectively).

The assay E.4 presented a biogas with a considerable bioH_2 content ($30.0\text{--}86.0\% \text{ v/v}$). Low biogas and bioH_2 flows and yield rates were registered ($34.8\text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $72.0\text{ mLH}_2.\text{g}^{-1}\text{VS}_{\text{removed}}$).

The results revealed that the pre-treatment applied to the inoculum was not effective, because it did not eliminate the methanogenic bacteria. However, the high content of bioH_2 obtained in the assay E.4 predicts that the potato peel can be a promising substrate for energy valorisation via DF.

Keywords: biohydrogen; dark fermentation; potato peel waste; pre-treatment.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.2. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÉNIO.....	4
1.2.1. Fermentação anaeróbia (<i>dark fermentation</i>).....	5
1.2.1.1. Vias metabólicas de produção de hidrogénio.....	7
1.2.1.2. Fatores/parâmetros influentes na fermentação anaeróbia	9
1.2.1.2.1. Temperatura	9
1.2.1.2.2. pH.....	11
1.2.1.2.3. Tempo de retenção hidráulico	13
1.2.1.2.4. Carga orgânica aplicada	16
1.2.1.2.5. Tipo de substrato	18
1.2.1.2.6. Inóculo	19
1.3. OBJETIVOS DA PRESENTE DISSERTAÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE BATATA.....	25
2.1.1. Determinação do teor de humidade	25
2.1.2. Determinação do teor de sólidos.....	26
2.1.2.1. Sólidos totais.....	26
2.1.2.2. Sólidos fixos (cinzas).....	26
2.1.2.3. Sólidos voláteis	27
2.1.3. Determinação da CQO.....	27
2.1.4. Determinação do azoto <i>kjeldahl</i>.....	29
2.1.5. Determinação do fósforo total	31
2.1.6. Caracterização elementar	32
2.2. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA.....	32
2.2.1. Bio-reator	33
2.2.2. Inóculo	34
2.2.3. Alimentação do digestor.....	35
2.2.3.1. Preparação do substrato orgânico (alimento).....	35
2.2.3.2. Alimentação do bio-reator	37
2.2.4. Caracterização físico-química das amostras de afluente e efluente	38
2.2.4.1. Teores de sólidos	38

2.2.4.2.	CQO	38
2.2.5.	Quantificação e caracterização do biogás	39
2.2.6.	Carga aplicada, eficiência de remoção e rendimentos de produção de biogás e bioH ₂	40
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE BATATA	43
3.2.	PRÉ-TRATAMENTOS (SUBSTRATO)	48
3.3.	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA	49
3.3.1.	ENSAIO E.7 (pH7)	49
3.3.1.1.	Parâmetros operacionais	49
3.3.1.2.	Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes	51
3.3.1.3.	Quantificação e caracterização do biogás	53
3.3.2.	ENSAIO E.6 (pH 6)	56
3.3.2.1.	Parâmetros	56
3.3.2.2.	Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes	57
3.3.2.3.	Quantificação e caracterização do biogás	58
3.3.3.	ENSAIO E.4 (pH 4)	60
3.3.3.1.	Parâmetros	60
3.3.3.2.	Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes	62
3.3.3.3.	Quantificação e caracterização do biogás	63
3.3.4.	PRINCIPAIS RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA	71
4.	CONCLUSÕES	75
5.	PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	77
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fontes de energia primárias utilizadas na produção de H ₂ (Das <i>et al.</i> , 2014).....	3
Figura 1.2 - Diferentes estratégias integradas de valorização dos produtos finais da DF (Adaptado e modificado de Ghimire <i>et al.</i> , 2015).....	5
Figura 1.3 - Diagrama simplificado da etapa hidrólise. (Lapa <i>et al.</i> , 2017).....	6
Figura 1.4 - Esquema simplificado do processo de degradação anaeróbia (Adaptado de Abreu, 2011)	7
Figura 2.1 - Resíduo de casca de batata (substrato orgânico) utilizado nos ensaios de fermentação.....	25
Figura 2.2 - Bio-reator anaeróbio de mistura completa. Legenda: Linha de entrada de afluente (1); Reator anaeróbio, em vidro com cinta de aquecimento, material de isolamento, sistema de agitação interna por pás e tampa com fixação de eléctrodos e tubagens (2); Linha de saída do efluente (3); Linha de saída de gás (4); Coluna de vidro graduada (5); Ampola de vidro para colheita de amostras de gás (6); Controlador de pH (7); módulos de controlo digital da T (8); módulo de leitura do potencial redox (9)	34
Figura 2.3 - (1) Casca de batata não tratada (tal como era obtida na indústria de aperitivos); (2) Casca de batata desidratada; (3) Casca de batata desidratada e triturada em moinho de lâminas.....	35
Figura 2.4 - Substratos de casca de batata pré-tratados por via térmica e termoquímica: (1) Substrato autoclavado (A.00); (2) Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água (95 °C) durante 30 min (A.30); Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água (95 °C) durante 60 min (A.60).....	36
Figura 3.1 - Teores de humidade e sólidos na casca de batata (as barras dos desvios-padrão são diminutas dado o seu reduzido valor; bh: base húmida) (número de amostras, <i>n</i> =3).....	43
Figura 3.2 - Valores médios e desvios-padrão da CQOs correspondentes aos pré-tratamentos testados (A.00: Substrato autoclavado; A.30: Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água durante 30 min.; A.60: Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água durante 60 min.).....	49
Figura 3.3 - Variação da temperatura, pH e potencial redox do interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.7. (A.A: Valores anteriores à alimentação; P.A: Valores posteriores à alimentação)	50
Figura 3.4 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.7.....	52
Figura 3.5 - Teores médios e desvios-padrão da CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes do digestor anaeróbio, relativos ao E.7 (as barras de erro são diminutas dado o seu baixo valor) ..	53

Figura 3.6 -Caudal médio de biogás, caudal de bioH ₂ e rendimento de produção de biogás relativo à CQOs removida e aos SV removidos (n.d.– Não detetado) (as barras dos desvios-padrão, relativas aos rendimentos, são diminutas dado o seu reduzido valor) (número de amostras, $n=3$).....	54
Figura 3.7 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás, ao longo do ensaio E.7	55
Figura 3.8 - Variação da temperatura, pH e potencial redox do interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.6. (A.A: Valores anteriores à alimentação; P.A: Valores posteriores à alimentação)	56
Figura 3.9 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.6.....	57
Figura 3.10 - Teores médios e desvios-padrão da CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.6.....	58
Figura 3.11 - Caudal de biogás/bioH ₂ e rendimento de produção de biogás por CQOs removida e SV removidos, relativos ao ensaio E.6 (n.d. - Não detetado).....	59
Figura 3.12 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás, ao longo do ensaio E.6	60
Figura 3.13 - Variação da temperatura n interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.4. (A.A: Valores anteriores à alimentação; D.A: Valores posteriores à alimentação)	61
Figura 3.14 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.4.....	62
Figura 3.15 - Teores médios e desvios-padrão de CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes no bio-reator, relativos ao ensaio E.4.....	63
Figura 3.16 - Caudais e rendimentos de produção (médios e máximos) de biogás e bioH ₂ , por unidade de massa de CQOs removida e SV removidos	67
Figura 3.17 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás e bioH ₂ , ao longo do ensaio E.4.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Comparação de diferentes combustíveis em relação ao conteúdo energético e emissões específicas de carbono associadas à sua combustão direta e excluindo as emissões de carbono ocorridas na produção do combustível (Adaptado de Das <i>et al.</i> , 2014).....	1
Tabela 3.1 - Caracterização elementar da casca de batata.....	43
Tabela 3.2 - Comparação dos resultados da caracterização físico-química do material de partida com dados da literatura	44
Tabela 3.3 - Comparação de razões C/N com dados obtidos da literatura.....	46
Tabela 3.4 - Comparação da razão C/P com dados da literatura.....	48
Tabela 3.5 - Comparação dos resultados de produção de hidrogénio com vários estudos.....	68
Tabela 3.6 - Resumo dos parâmetros de controlo avaliados durante os ensaios de fermentação no escuro	74

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

adi.– Adimensional

AGV'_s– Ácidos gordos voláteis

AOV'_s– Ácidos orgânicos voláteis

ATP – Adenosina trifosfato

BESA – 2-bromoetanosulfonato

bh – Base húmida

BioH₂ – Biohidrogénio

bs – Base seca

C – Carbono

CA – Carga orgânica aplicada

CH₄– Metano

CO₂– Dióxido de carbono

CQO_{ad.} – Carência química de oxigénio adicionada

CQOs – Carência química de oxigénio solúvel

CQOt – Carência química de oxigénio total

CSTR – *Completely stirred tank reactor* (reator biológico de mistura completa)

DCTB – Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa

DF – *Dark Fermentation* (fermentação anaeróbia no escuro)

DQ – Departamento de Química

E.4 – Ensaio realizado a pH 4

E.6 – Ensaio realizado a pH 6

E.7 – Ensaio realizado a pH 7

ED – Entner-Doudoroff

EMP – Embden-Meyerhof-Parnas

ETVO – Estação de Tratamento e Valorização Orgânica

FCT–UNL – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Fd – Ferredoxina

Fd(ox) - Ferredoxina oxidoreductase

Fd(red) – Ferredoxina reduzida

g – Força centrífuga

GC–TDC – Cromatografia gasosa com detetor de condutividade térmica

H₂ – Hidrogénio

HS – *Headspace*

L_r – Litro de reator

MO– Matéria orgânica

n.d – Não detetado

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

$\bar{Q}_{\text{biogás}}$ – Caudal médio de biogás

\bar{Q}_{bioH_2} – Caudal médio de biohidrogénio

PEMFC – Células de combustível com membrana polimérica trocadora de prótons

pH_{in.} – pH inicial

P-total – Fósforo total

Q_{máx.biogás} – Caudal máximo de biogás

Q_{máx.bioH₂} – Caudal máximo de biohidrogénio

SF – Sólidos fixos

ST – Sólidos totais

SV – Sólidos voláteis

SV_{ad.} – Sólidos voláteis adicionados

TKN – total kjeldahl nitrogen (azoto total de *Kjeldahl*)

TRH – Tempo de retenção hidráulico

$\eta_{\text{biogás}}$ (CQOs removida) – Rendimento de produção de biogás relativo à carência química de oxigénio removida

$\eta_{\text{biogás}}$ (SV removidos) – Rendimento de produção de biogás relativo aos sólidos voláteis removidos

η_{bioH_2} (CQOs removida) – Rendimento de produção de biogás relativo à carência química de oxigénio removida

η_{bioH_2} (SV removidos) – Rendimento de produção de biohidrogénio relativo aos sólidos voláteis removidos

$\eta_{\text{máx.bioH}_2}$ (CQOs removida) – Rendimento máximo de produção de biohidrogénio relativo à carência química de oxigénio removida

$\eta_{\text{máx.bioH}_2}$ (SV removidos) – Rendimento de produção de biohidrogénio relativo aos sólidos voláteis removidos

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO

O consumo de energia tem aumentado consistentemente nas últimas décadas. No ano de 2014 registou-se um consumo energético, cerca de 50% superior ao consumo relativo ao ano de 1971, tendo as emissões de CO₂ aumentado na mesma ordem de grandeza. Cerca de 84% deste consumo é realizado com base em energias não renováveis (IEA, 2016). A manutenção de um desenvolvimento sustentável encontra-se dependente do abrandamento deste consumo, concomitantemente com o aumento da eficiência energética e investimento em fontes de energia renováveis.

Um dos combustíveis mais "limpos" e com maior potencial para se tornar uma alternativa viável a determinados combustíveis convencionais é o hidrogénio (Bharathiraja *et al.*, 2016; Liu & Wu, 2016). O hidrogénio pode ser utilizado em motores de combustão interna e em células de combustível (Ghimire *et al.*, 2015a), apresentando esta última tecnologia três vezes mais eficiência de conversão em relação a motores que utilizam gasolina (Rahman *et al.*, 2016). Este gás tem a vantagem de poder ser transportado através de meios convencionais para fins domésticos e industriais (Batista *et al.*, 2014; Das, 2009).

Existem uma série de benefícios associados à utilização do H₂: por exemplo, dos combustíveis conhecidos, é o que possui o maior conteúdo energético, por unidade de massa, e as menores emissões específicas de carbono (Batista *et al.*, 2014) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Comparação de diferentes combustíveis em relação ao conteúdo energético e emissões específicas de carbono associadas à sua combustão direta e excluindo as emissões de carbono ocorridas na produção do combustível (Adaptado de Das *et al.*, 2014)

Combustível	Estrutura química	Teor de carbono (%)	Matéria-prima	Teor energético (J.kg ⁻¹)	Emissões específicas de carbono (kgC.Kg ⁻¹ combustível)
Hidrogénio	H ₂	0	Gás natural, electrólise da água, metanol, biomassa	141,9	0,00
Etanol	C ₂ H ₅ OH	52	Milho, grãos, resíduos agrícolas (celulose)	29,9	0,50
Biodiesel	Ésteres metílicos de C ₁₂ a C ₂₂ , ácidos gordos	77	Gordura animal e vegetal como grãos de soja, óleo alimentar usado	37,0	0,50

Tabela1.1 - Comparação de diferentes combustíveis em relação ao conteúdo energético e emissões específicas de carbono associadas à sua combustão direta e excluindo as emissões de carbono ocorridas na produção do combustível (Adaptado de Das *et al.*, 2014) (cont.)

Metanol	CH ₃ OH	37,5	Gás natural, carvão, biomassa lenhosa	22,3	0,50
Gás natural	CH ₄	75,0	Reservas subterrâneas	50,0	0,46
Gasolina	C ₄ a C ₁₂	74,0	Crude	47,4	0,86

Apesar do H₂ possuir características muito interessantes no sentido da sua utilização para fins energéticos, representa apenas cerca de 3% do consumo total de energia, tendo um crescimento anual estimado em 5–10% (Mohan *et al.*, 2006). Existem previsões mais optimistas que prenunciam uma contribuição do H₂ no leque das necessidades totais de energia de 11%, em 2025, 27%, em 2030, e 34%, em 2050 (Trchounian *et al.*, 2017; Balat & Balat, 2009).

A maior parte do hidrogénio produzido é destinado à síntese de amónia (49%), refinação de petróleo (37%), fabrico de metanol (8%) e outros usos com baixa expressão (6%) (Konieczny *et al.*, 2008).

O hidrogénio, não é uma fonte primária de energia (não existe livremente na natureza), pelo que tem que ser produzido a partir de fontes ricas neste elemento (Das *et al.*, 2014; Balat & Kirtay, 2010). Grande parte dos benefícios ambientais associados à utilização do H₂ prendem-se com a sua produção a partir de fontes renováveis, como a biomassa e eletrólise da água, caso a energia elétrica utilizada neste último processo seja também ela obtida a partir de fontes renováveis. Atualmente, a maior fração do hidrogénio (88%) é produzido a partir de fontes não renováveis, tendo por base tecnologias energeticamente intensivas, como a conversão do gás natural, óleos pesados e nafta, bem como da gasificação de carvão (Ghimire *et al.*, 2015a) (figura 1.1).

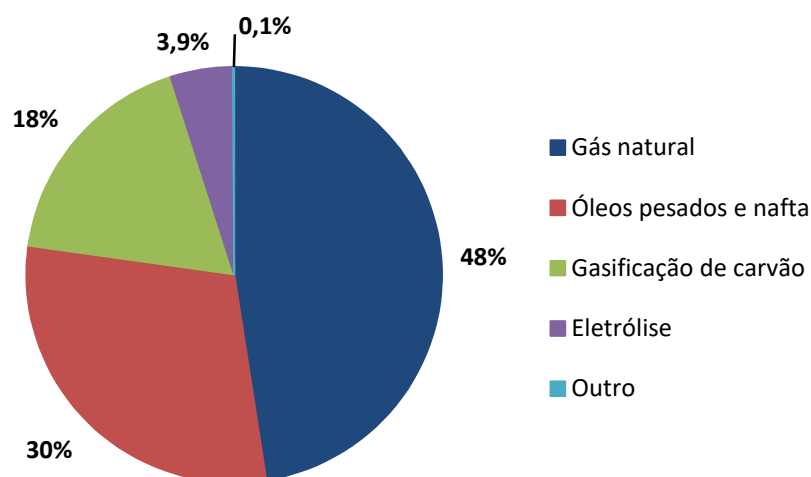


Figura 1.1 - Fontes de energia primárias utilizadas na produção de H₂ (Das *et al.*, 2014).

A percentagem do hidrogénio produzido a partir de biomassa é muitíssimo reduzida, representando apenas menos de 0,1% de toda a produção. É importante aumentar a expressão da utilização de biomassa neste leque de fontes, constituindo os resíduos (resíduos sólidos urbanos, industriais e agrícolas, entre outros) algumas das opções mais interessantes. A utilização de resíduos para fins energéticos tem um elevado potencial dos pontos de vista ambiental e económico.

No que diz respeito aos resíduos sólidos urbanos, foram produzidos em Portugal continental, no ano de 2016, 2 122 579t, das quais apenas 824 678t foram sujeitas a valorização energética, sendo a maior parte depositada em aterro (PORDATA, 2018). Esta prática tem custos sociais, financeiros e ambientais associados, contribuindo para o aumento das alterações globais, como a contaminação dos lençóis freáticos por lixiviação, degradação dos solos, emissões de gases com efeito de estufa, depleção da camada do ozono e chuvas ácidas (Alexandropoulou *et al.*, 2018).

A valorização dos resíduos pode ajudar na redução da fatura energética por parte das empresas, tanto através da utilização de matérias-primas consideradas de baixo custo (Ghimire *et al.*, 2015a; Yasin *et al.*, 2013), como pela diminuição dos custos associados à sua deposição em aterro. O aperfeiçoamento das tecnologias que utilizam fontes renováveis contribui também, de maneira significativa, para a redução da dependência de combustíveis fósseis e consequentemente para a segurança do aprovisionamento energético.

A indústria agroalimentar gera grandes quantidades de resíduos. Por exemplo, as batatas representam a quarta mais importante cultura agrícola mundial, tendo à sua frente apenas o milho, o arroz e o trigo – em Portugal, no ano de 2016, foram produzidas 451 000t de batatas (EUROSTAT, 2018). Uma grande fração das batatas produzidas é sujeita a processamento para produção de batatas fritas, alimentos enlatados e amido, com consequente geração de uma

grande quantidade de resíduos, nomeadamente casca de batata (Liang & McDonald, 2014). Este resíduo contém uma grande quantidade de glúcidos, sobretudo amido, facilmente digeríveis por via biológica (Liang *et al.*, 2015, 2014). Na medida em que os principais critérios utilizados na escolha da biomassa utilizada na produção de biohidrogénio são a disponibilidade, biodegradabilidade, custo e teor em hidratos de carbono (Stavropoulos *et al.*, 2016), a casca de batata revela-se um substrato muito atraente para utilização em fermentação anaeróbia (Yasin *et al.*, 2011; Holladay *et al.*, 2009).

1.2. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÉNIO

O hidrogénio pode ser produzido através de processos termoquímicos ou processos biológicos; para se distinguir do hidrogénio produzido pelos primeiros, o hidrogénio produzido por processos biológicos designa-se por biohidrogénio (bioH₂). Os processos termoquímicos possuem uma maior eficiência de conversão, no entanto, geram aproximadamente a mesma quantidade de CO₂ que a combustão direta de combustíveis fósseis (Zieliński *et al.*, 2017; Rhaman *et al.*, 2016). Os processos biológicos são energeticamente menos intensivos e apresentam benefícios do ponto de vista ambiental (Ghimire *et al.*, 2015a; Demirbas, 2008; Das & Veziroğlu, 2001).

As tecnologias de produção de biohidrogénio incluem: (i) **biofotólise** directa e indirecta, que recorrem à utilização de microrganismos autotróficos (p.e. algas e bactérias fotossintéticas) para a conversão direta de energia solar em bioH₂, através da fotossíntese; (ii) a **fermentação no escuro (DF)**, levada a cabo por bactérias anaeróbias, que convertem glúcidos em bioH₂; (iii) a **fotofermentação**, realizada por bactérias fotossintéticas; e (iv) **processos híbridos**. De entre estas tecnologias, a DF é a preferida, embora ainda existam alguns constrangimentos, como o baixo rendimento, baixa taxa de produção de H₂ (Bundhoo & Mohee, 2016) e baixa taxa de conversão de matéria orgânica, que tendem a limitar o seu potencial de comercialização num futuro próximo (Ren *et al.*, 2011). As limitações referidas podem ser ultrapassadas com recurso a sistemas híbridos, resultando no aumento da viabilidade industrial do processo (Das, 2009; Kotay & Das, 2008). A valorização dos produtos finais da DF (figura 1.2) pode ser realizada quer através do aumento do rendimento de produção de hidrogénio (fotofermentação e células de electrólise microbiana), quer pela produção de metano através de digestão anaeróbia (DA), podendo o processo de DA ser ainda considerado um passo de estabilização final de resíduos (Silva-Illanes *et al.*, 2017; Ghimire *et al.*, 2015).

Caso atinja a maturidade, o processo de fermentação anaeróbia no escuro pode tornar-se um importante aliado da produção descentralizada de energia (Bharathiraja *et al.*, 2016; Rhaman *et al.*, 2016). A construção de bio-reactores anaeróbios em locais próximos da produção de resíduos, associada ao baixo custo deste tipo de substrato são fatores essenciais à viabilidade económica da produção de bioH₂ (Ghimire *et al.*, 2015a; Balat & Balat, 2009).

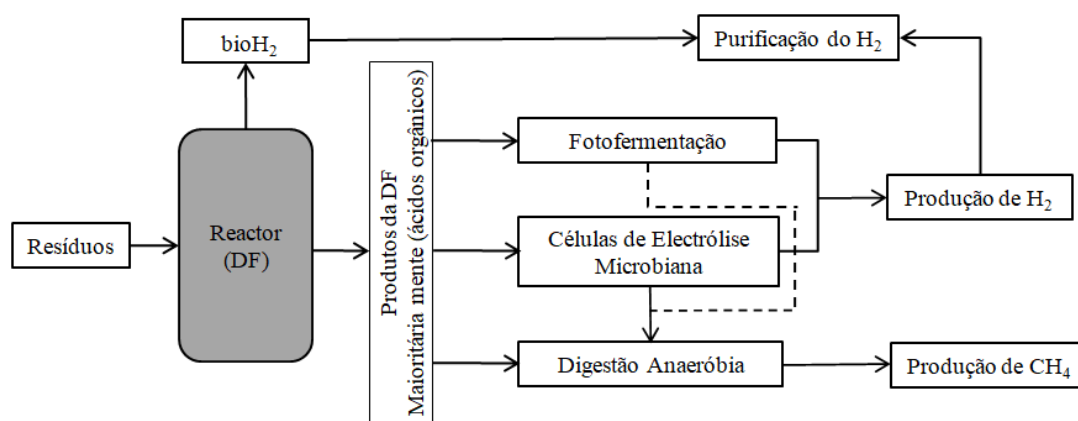


Figura 1.2 - Diferentes estratégias integradas de valorização dos produtos finais da DF (Adaptado e modificado de Ghimire *et al.*, 2015).

1.2.1. Fermentação anaeróbia (*dark fermentation*)

A fermentação anaeróbia no escuro é o processo de conversão fermentativa de substratos orgânicos em biohidrogénio, num ambiente privado de luz e oxigénio (Das *et al.*, 2014; Manish & Banerjee, 2008), em condições anaeróbias sendo um fenómeno ubíquo (Das *et al.*, 2008). Este processo é levado a cabo por: (i) diversos grupos de bactérias heterotróficas anaeróbias (facultativas e/ou obrigatórias) (Bharathiraja *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2016) como são os casos de algumas espécies pertencentes aos géneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (Levin *et al.*, 2004); (ii) por algumas algas (Holladay *et al.*, 2009); e (iii) alguns grupos de bactérias aerotolerantes (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). A independência de luz constitui uma grande vantagem em relação à biofotólise e à fotofermentação, pois permite a produção contínua durante todo o dia, sem recurso a fontes adicionais de energia para iluminação (Palomo-Briones *et al.*, 2017; Trchounian *et al.*, 2017; Rhaman *et al.*, 2016).

Durante a DF ocorre a conversão microbiológica de compostos orgânicos complexos numa série de produtos orgânicos e inorgânicos mais simples, através de fenómenos de oxidação e redução. É a partir da oxidação-redução que as bactérias fermentativas obtêm a sua energia, produzindo compostos orgânicos e inorgânicos simples durante o processo (Gerardi, 2003).

Este processo ocorre durante as primeiras três etapas da digestão anaeróbia (Krupp & Widmann, 2009): **hidrólise** de polímeros por microrganismos hidrolíticos, **acidogénese** de compostos orgânicos simples por bactérias fermentativas e **acetogénese** dos metabolitos da fermentação por bactérias homoacetogénicas ou sintróficas (Garcia *et al.*, 2000).

O processo inicia-se com a fase de **hidrólise** (figura 1.3) essencial para que as bactérias possam utilizar biopolímeros complexos, como polissacarídeos, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos.

Nesta etapa, as bactérias fermentativas produzem enzimas hidrolíticas (celulases, amilases, lipases, proteases, entre outras.), que catalisam a degradação das biomoléculas usadas como substratos. Algumas das enzimas, utilizadas durante o processo, mantêm-se ligadas à superfície celular enquanto outras são libertadas para o meio extracelular (Bastidas-Oyanede *et al.*, 2015).

Este é, geralmente, um processo lento, principalmente no que toca à hidrólise dos lípidos. É de ressaltar ainda que nem toda a matéria orgânica é biodegradada, restando uma porção particulada e/ou insolúvel, portanto inerte (Fonseca *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos são normalmente decompostos nos seus mono ou dissacarídeos constituintes, sendo o amido, a título de exemplo, convertido em glucose. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos, pequenos péptidos e dióxido de carbono. Os triglicéridos são degradados em ácidos gordos e glicerol (Morrison & Boyd, 2005).

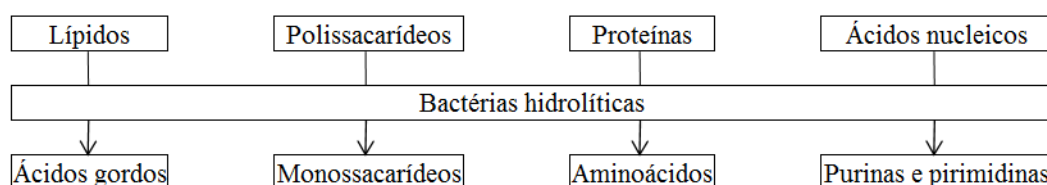


Figura 1.3 - Diagrama simplificado da etapa hidrólise (Lapa *et al.*, 2017).

Na etapa da **acidogénese** os produtos da hidrólise vão passar para o meio intracelular, sendo convertidos em produtos intermediários como etanol, acetato, propionato, butirato, succinato, álcoois, dióxido de carbono e hidrogénio (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2007).

Na **acetogénese** ocorre a conversão dos produtos intermediários em acetato, CO₂ e H₂. Esta etapa é levada a cabo pela ação de bactérias sintróficas (produtoras obrigatórias de hidrogénio) e por bactérias homoacetogénicas que produzem acetato a partir de CO₂/H₂ ou de compostos multicarbonados (p.e. açúcares) (Fonseca *et al.*, 2007). As reações realizadas pelas bactérias acetogénicas são termodinamicamente desfavoráveis só se tornando exergónicas com baixa pressão de H₂ (Fonseca *et al.*, 2007). À medida que se verifica o aumento da pressão parcial de H₂ na fase líquida, a ação da enzima hidrogenase no processo de oxidação da ferredoxina torna-

se menos favorável, levando à diminuição da produção de H_2 (Ghimire *et al.*, 2015a). Quando o bio-reator opera com culturas mistas, caso existam sulfatos ou nitratos, em baixas quantidades, as bactérias sulfato-redutoras (Fonseca *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 1995) e nitrato-redutoras (Abreu, 2011) vão ocupar um papel importante na redução da pressão parcial de H_2 , visto que são capazes de utilizar hidrogénio como recetor final de eletrões, gerando sulfitos e amónia. Assim, as bactérias consumidoras de hidrogénio podem assumir tanto o papel de regulação das vias fermentativas, permitindo aumentar o rendimento de produção de H_2 (Fonseca *et al.*, 2007; CCE, 2000), como de competidores pelo substrato ou produtores de substâncias tóxicas (p.e. ácido sulfídrico) que causam inibição da produção de H_2 (Bundhoo & Mohee, 2016).

A figura 1.4 representa um esquema simplificado do processo.

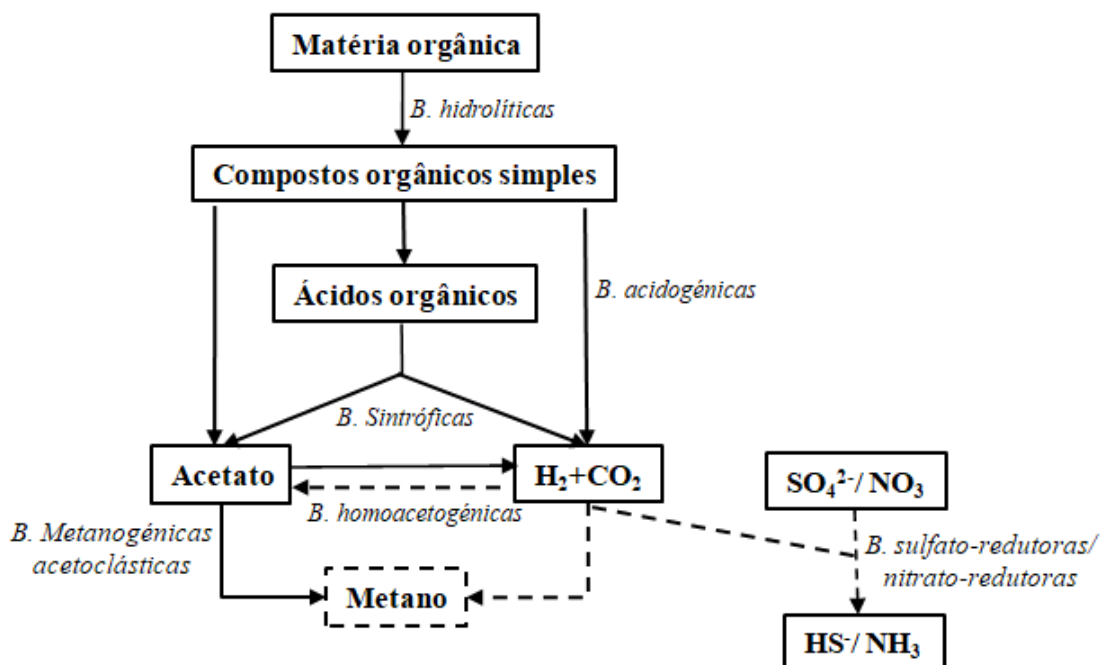


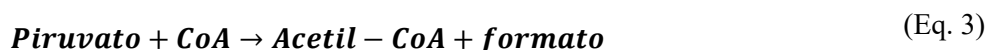
Figura 1.4 - Esquema simplificado do processo de degradação anaeróbia (Adaptado de Abreu, 2011).

1.2.1.1. Vias metabólicas de produção de hidrogénio

No processo de fermentação no escuro, a oxidação de substratos ricos em glúcidos leva à libertação de eletrões que têm que ser depositados de modo a manter a neutralidade intracelular. Em condições anaeróbias, os protões (H^+) funcionam como recetores de eletrões, ocorrendo a formação de hidrogénio molecular (H_2), o processo é catalisado pela enzima hidrogenase (Ghimire *et al.*, 2015a; Li & Fang, 2007; Das & Veziroğlu, 2001).

As duas principais vias fermentativas incluem as vias Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e Entner-Doudoroff (ED). Os grupos de bactérias mais envolvidos na fermentação no escuro

(bactérias do género *Clostridium* e bactérias entéricas) utilizam a via EMP na oxidação de glúcidos (Abreu, 2011). Durante a via EMP (glicólise), a glucose é convertida em piruvato, através da via glicolítica, obtendo-se adenosina trifosfato (ATP), a partir da adenosina difosfato (ADP) e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (Ghimire *et al.*, 2015). O piruvato é posteriormente oxidado a acetil-coenzima A (acetil-CoA), CO₂ e H₂ pelas enzimas ferredoxina oxidoreductase (Fd(ox)) e hidrogenase (equações 1 e 2) (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015; Ghimire *et al.*, 2015), ou pela enzima piruvato formato liase (equação 3) (Bharathiraja *et al.*, 2016). A oxidação que origina acetil-CoA é realizada através da redução da ferredoxina (Fd). A ferredoxina reduzida (Fd(red)) é oxidada pela hidrogenase, que regenera a Fd(ox), com libertação de H₂ (Das *et al.*, 2008).



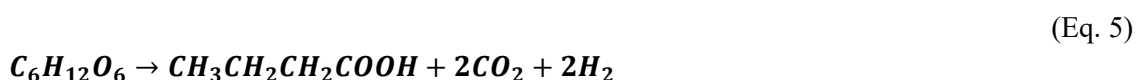
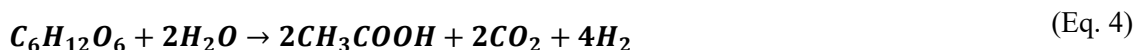
As bactérias entéricas produzem H₂ a partir do formato enquanto que as bactérias estritamente anaeróbias utilizam Fd(re) (Bharathiraja *et al.*, 2016).

O rendimento de produção de H₂ está relacionado com a quantidade e variedade de produtos obtidos (García-Depraect *et al.*, 2017). Os produtos reduzidos como o etanol, o butanol, entre outros, contêm hidrogénio que não foi libertado sob a forma de gás, sendo importante desviar o metabolismo microbiano no sentido de mais produção de ácidos gordos voláteis (AGV's) e menos álcoois e ácidos reduzidos (Bharathiraja *et al.*, 2016).

Os tipos de produtos obtidos dependem das bactérias envolvidas; por exemplo, bactérias da espécie *Escherichia coli* produzem uma grande diversidade de produtos, enquanto que bactérias do género *Acetobacterium* produzem um reduzido número (Gerardi, 2003). As condições ambientais, como a fonte e disponibilidade de carbono, pH, pressão parcial de H₂, temperatura, entre outras, influenciam a estrutura da comunidade microbiana, bem como o seu metabolismo, alterando o tipo e quantidade de compostos produzidos durante a fermentação (Trchounian *et al.*, 2017; Ghimire *et al.*, 2015a; Louis & Flint, 2009; Gerardi, 2003).

De entre um grande número de potenciais produtos finais gerados através do metabolismo microbiano, quando se obtém acetato como único produto final e usando a glucose como substrato modelo, o processo fermentativo pode alcançar um rendimento máximo teórico de 4

mol H₂.mol⁻¹ glucose (equação 4), enquanto que a via do butirato permite alcançar um rendimento de apenas 2 mol H₂.mol⁻¹ glucose (equação 5) (Urbaniec & Bakker, 2015; Krupp & Widmann, 2009). Na prática não é possível alcançar o rendimento máximo visto que, regra geral, ambos os produtos se encontram presentes como produtos finais (Ni *et al.*, 2006). Outro fator que faz com que não seja possível atingir o rendimento máximo teórico é o facto de parte do substrato ser utilizado para produção de biomassa (Ghimire *et al.*, 2015a; Gerardi, 2003).



A análise dos metabolitos solúveis pode ser um indicador das vias metabólicas que estão a ser seguidas (Ghimire *et al.*, 2015). No entanto, embora a via do acetato seja a que resulta em maiores rendimentos de H₂, a sua acumulação no meio não significa necessariamente um aumento na produção de hidrogénio, visto que algumas espécies do género *Clostridium* (p.e. *C. aceticum*) são também capazes de produzir acetato por conversão de H₂ e CO₂ (Hawkes *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006b) (equação 6).



Os produtos finais menos interessantes, por não resultarem na produção de H₂ são o ácido láctico e o ácido propiónico (Yasin *et al.*, 2013).

1.2.1.2. Fatores/parâmetros influentes na fermentação anaeróbia

1.2.1.2.1. Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros que mais influencia o metabolismo microbiano, a taxa de hidrólise do substrato e consequentemente a produção de biohidrogénio (Ghimire *et al.*, 2015a; Yasin *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2010). A temperatura ótima varia em função do substrato, inóculo e parâmetros operacionais utilizados (Bharathiraja *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2010).

A DF pode realizar-se numa ampla gama de temperaturas. A grande maioria dos estudos com culturas mistas foram realizados na gama mesófila (20–45 °C) ou termófila (>45 °C), existindo poucos estudos que utilizam a gama psicrófila (<20 °C) (Arslan *et al.*, 2015; Abreu, 2011).

A gama termófila tem vindo a resultar em rendimentos de produção de H₂ elevados, no entanto, segundo Trchounian *et al.* (2017) e Yasin *et al.* (2013), apesar dos melhores resultados obtidos, a manutenção de temperaturas elevadas pode constituir uma limitação à escala industrial, devido ao maior dispêndio de energia para aquecimento dos bio-reactores. Ghimire *et al.* (2015a), pelo contrário, refere que, caso sejam utilizadas temperaturas mais elevadas, o processo apresentará maior viabilidade económica, tanto pela obtenção de rendimentos de produção de bioH₂ mais elevados, como pela necessidade de empregar menores quantidade de substrato (maior taxa de conversão). Torna-se assim importante a realização de estudos de viabilidade económica e financeira, caso a caso.

Na gama mesófila tende a verificar-se um rendimento mais reduzido, devido ao facto de as reações químicas se tornarem termodinamicamente mais desfavoráveis a temperatura mais baixa – ocorre a diminuição da entropia com a diminuição da temperatura (equação 7) (Bharathiraja *et al.*, 2016) – bem como da seleção microbiana, tendendo ao favorecimento do crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico que inibem as bactérias produtoras de hidrogénio. Xiao *et al.* (2013) investigaram o efeito da temperatura (21,5 °C e 37 °C) na produção de bioH₂ através de fermentação no escuro de resíduos alimentares. Utilizaram culturas puras de *Enterobacter aerogenes* II e *Escherichia cloacae*, duas espécies anaeróbias facultativas mesófilas, tendo obtido os melhores resultados com a temperatura de 37 °C (93,3 mL H₂.g⁻¹ SV) do que com a temperatura de 21,5 °C (38,9 mL H₂.g⁻¹ SV). Os autores referem o resultado como expectável, na medida em que temperaturas muito superiores ou inferiores à temperatura ótima destas bactérias, resultam numa menor atividade das mesmas.

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T. \Delta S^{\circ} \quad (\text{Eq. 7})$$

Embora seja amplamente reconhecido que as bactérias mesófilas e termófilas produzem bioH₂ a uma taxa mais elevada do que a gama psicrófila, esta última começa a ser vista como uma janela de oportunidade de produção de bioH₂ à temperatura ambiente, o que permitiria remover do processo os custos financeiros associados ao dispêndio de energia para aquecimento dos bio-reactores. Zieliński *et al.* (2017) obtiveram resultados promissores, a partir da fermentação no escuro de soro de queijo e glucose, a 20 °C, utilizando várias estirpes de bactérias psicrófilas. O rendimento de produção de bioH₂ mais elevado (58,1 mL H₂.g⁻¹ CQO) foi obtido a partir da fermentação de soro de queijo, com teores de H₂ no biogás a atingir os 43,2% v/v. Os resultados foram superiores aos obtidos por Stavropoulos *et al.* (2016) (24,3 mL H₂.g⁻¹ CQO e 28,7% v/v) a partir da fermentação mesófila (37 °C) de produtos lácteos em fim de vida. Os autores referem que algumas bactérias psicrófilas são capazes de produzir biogás em quantidades consideráveis, quando colocadas em condições semelhantes às dos seus *habitats* naturais.

A escolha da temperatura ótima deve ser realizada em função do tipo de substrato e inóculo utilizado. Regra geral, os substratos mais dificilmente biodegradáveis, como é o caso dos lenhocelulósicos, necessitam de temperaturas mais elevadas, enquanto que na degradação de substratos mais facilmente biodegradáveis, podem ser utilizadas temperaturas inferiores para a obtenção de rendimentos ótimos de bioH₂ (Ghimire *et al.*, 2015a).

É ainda importante referir que, independentemente da gama de temperatura utilizada, é de capital importância a manutenção da estabilidade deste parâmetro, dado que variações bruscas de temperatura podem causar a perturbação do metabolismo microbiano, resultando no desequilíbrio do sistema que pode necessitar de alguns dias para recuperar o equilíbrio (CCE, 2000).

1.2.1.2.2. pH

O pH desempenha um papel crucial na produção de biohidrogénio (Stavropoulos *et al.*, 2016), através da regulação da atividade enzimática, estrutura das comunidades microbianas e suas vias metabólicas (Alexandropoulou *et al.*, 2018; Yasin *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2010).

Alguns autores referem valores de pH rondando os 5,5 como favoráveis a um bom desempenho de produção de bioH₂, em bio-reactores que operam com culturas mistas. Próximo deste valor de pH ocorre a redução da atividade de bactérias hidrogenotróficas, como as metanogénicas, e bactérias redutoras de sulfato (Ghimire *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2010). É também neste valor de pH que ocorre o pico de atividade da enzima hidrogenase, bem como da manutenção de uma boa capacidade tampão (Kumar *et al.*, 2015). Apesar destes argumentos, a gama de pH ótimo é bastante variável entre diferentes estudos.

Stavropoulos *et al.* (2016) investigaram a influência do pH (4,0–5,7) na produção de bioH₂, a partir de uma mistura de produtos lácteos em final de vida (iogurte, leite e queijo). Utilizaram um bio-reactor contínuo com mistura completa (CSTR), com as condições operacionais de 37 °C e TRH=6d. O estudo abordou também a componente metabólica através da análise dos metabolitos produzidos e a sua correlação com a produção de bioH₂. A conversão ótima foi obtida com o pH 5,0 (40,6 mL H₂.g⁻¹ SV_{ad.} e 24,3 mL H₂.g⁻¹ CQO_{ad.}), tendo sido a produção de bioH₂ maioritariamente associada à conversão de ácido láctico em ácido butírico

De Giannakis *et al.* (2014) estudaram o efeito do pH (5,5–8,5) no processo de fermentação no escuro, em condições termófilas (39 ± 1 °C), de dois substratos, um deles constituído pela mistura de efluentes de produção de queijo de vaca e ovelha e o outro efluente constituído por apenas leite de vaca. Os autores verificaram uma grande influência do pH, tanto a nível do rendimento de bioH₂, como no seu teor no biogás. Observaram também diferenças significativas

entre os dois substratos. Os melhores resultados foram obtidos a partir da fermentação do substrato que continha apenas leite de vaca, com rendimentos de produção entre 50,7 NL H₂.kg⁻¹ SV, para o pH 7,5 e 85,8 NL H₂.kg⁻¹ SV, para o pH 6,5. Quanto ao teor de H₂ no biogás, observou-se um aumento do mesmo com o incremento do valor de pH, tendo obtido valores entre 47,4% v/v, com o pH 5,5, e 91,8% v/v, para pH 7,5. Os melhores resultados obtidos no ensaio realizado com a mistura de efluentes foram obtidos com o pH 7,5 (45,1 NL H₂.Kg⁻¹ SV), demonstrando que o pH ótimo se encontra fortemente dependente do substrato utilizado.

Fang & Zhang (2006) referem o pH 4,5 como ótimo na fermentação de pasta de arroz. Lee *et al.* (2002) apresentam o pH 9,0 como o ideal na fermentação mesófila (37 °C) de sacarose, tendo obtido os piores resultados com os valores de pH de 5,0 e 5,5.

Hallenback & Gosh (2009) referem que valores de pH inferiores a 4,0 podem levar à ocorrência de perturbações a nível da manutenção celular, com uma brusca diminuição da produção de H₂. Isto ocorre porque a ATP vai ser redirecionada da produção de H₂ para a manutenção da neutralidade celular (Arslan *et al.*, 2015). A diminuição acentuada de ATP leva à inibição de enzimas tão importantes como a hidrogenase. Podem ocorrer ainda alterações fisiológicas, como do potencial de membrana, concentração de iões, bem como do valor do pH intracelular (Bharathiraja *et al.*, 2016). Ghimire *et al.* (2017) também referem que valores de pH inferiores a 4,5 tendem a inibir o processo de fermentação no escuro.

Outro argumento contra a utilização de valores de pH muito reduzidos prende-se com o impacto que podem ter na fase de hidrólise, uma vez que um pH reduzido no início do ensaio pode levar a uma menor taxa de conversão do substrato (Yasin *et al.*, 2013). Existem vários estudos que corroboram a importância de um pH neutro ou alcalino na fase de hidrólise. Xiao *et al.* (2013) investigaram o efeito do pH inicial (5,0–8,0) na produção biológica de hidrogénio a partir de resíduos alimentares, tendo obtido os melhores resultados com o pH 7,0 no afluente (93,3 mL H₂.g⁻¹ SV) e os piores resultados com os valores de pH 5,0 e 6,0 (5,80 e 12,7 mL H₂.g⁻¹ SV, respetivamente), tendo a produção de bioH₂ praticamente parado a partir de valores de pH inferiores a 5,1. Qiu *et al.* (2017) também referem uma gama de pH_{in.} entre 6,0 e 7,0 como benéfica para a produção de biohidrogénio.

Mota *et al.* (2018) vêm confrontar a forte convicção presente na literatura de que pH's muito reduzidos (pH<4,0) não são compatíveis com a produção de bioH₂. Estes autores investigaram a hipótese de produzir bioH₂ com valores de pH muito reduzidos (pH<3,0). Para tal, realizaram uma primeira fase onde testaram três tipos de bio-reactores (leito fixo, leito fluidizado granular e floculante) para realizar a fermentação no escuro de sacarose, a 37 °C, sem qualquer controlo de pH. Numa segunda fase utilizaram o bio-reator de leito fluidizado granular, aplicando um TRH

de 4,6h, tendo obtido os melhores resultados com um pH de 2,7 (3,4 mol H_2 .mol⁻¹ sacarose). Concluíram que, um ambiente muito ácido pode favorecer o desenvolvimento de bactérias tolerantes (p.e. *Clostridium* sp. e *Ethanoligenens* sp.) capazes de produzir bioH₂ com valores de pH extremos.

Uma possível explicação para o desacordo entre os diversos estudos poder ser a diferença entre o tipo de inóculo e outras condições operacionais aplicadas no processo, sendo importante averiguar qual o pH ótimo para uma dada carga orgânica aplicada, inóculo e temperatura (Stavropoulos *et al.*, 2016; Arslan *et al.*, 2015; Ghimire *et al.*, 2015a).

Para além do pH ótimo, a manutenção de um pH estável é também de capital importância, na medida em que pequenas oscilações neste parâmetro podem ter grande impacto na produção de bioH₂. Silva-Illanes *et al.* (2017) observaram um declínio no rendimento de H₂, na ordem dos 40–50%, com a alteração do pH de 5,5 para 6,0, na fermentação no escuro de glicerol, em condições mesófilas (37 °C).

A aplicação de bases ou ácidos para controlo de pH pode ser necessária para a manutenção de um pH estável e dentro dos valores desejados. No entanto, a sua utilização pode gerar impactes ambientais, bem como inviabilizar a valorização dos efluentes do processo de fermentação no escuro. Uma opção sustentável, bem como mais económica para este problema, pode passar pela utilização de co-substratos mais ácidos ou alcalinos para equilibrar o pH do interior do bio-reator. Ghimire *et al.* (2017) investigaram a viabilidade da fermentação no escuro de soro proveniente da produção de queijo (pH ácido) utilizando estrume de búfalo, caracterizado como tendo uma elevada alcalinidade, para a manutenção de um pH adequado à produção de bioH₂. Os autores confirmaram a adequabilidade da utilização deste co-substrato, tendo obtido um rendimento e uma produção máxima de bioH₂ de $152 \pm 43,9$ mL H_2 .g⁻¹ SV e $215 \pm 62,1$ mL H_2 .L_r⁻¹.d⁻¹, respetivamente, com a manutenção de um intervalo estável de pH (4,8–5,0).

1.2.1.2.3. Tempo de retenção hidráulico

O tempo de retenção hidráulico (TRH), ou tempo de fermentação, consiste no período de tempo útil que um determinado volume de líquido é retido no bio-reator, até passar por todas as fases do processo, antes de ser removido (Alexandropoulou *et al.*, 2018; Mohammadi, 2012).

Esta variável influencia significativamente a hidrólise e consequentemente a produção de intermediários e produtos da fermentação (Ghimire *et al.*, 2015; Holladay, 2009). O TRH é também responsável pela regulação da comunidade microbiana, podendo favorecer a dominância de microrganismos produtores de H₂ em detrimento de outros menos interessantes para o processo (Silva-Illanes *et al.*, 2017). A aplicação de TRH's curtos encontra-se associada à

restrição de bactérias metanogénicas (Bharathiraja *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2015a; Guo *et al.*, 2010). Este grupo de bactérias apresenta uma reduzida taxa de crescimento (aprox. $0,2 \text{ h}^{-1}$), o que faz com que a aplicação de valores de TRH reduzidos ($<8\text{h}$) levem à sua eliminação do bio-reactor (*washout* celular), caso não ocorra a existência de biofilmes (Guo *et al.*, 2010). TRH's elevados estão também associados a uma elevada produção de AGV's, que podem ser acompanhados por baixa produção de H_2 (Dareioti & Kornarus, 2014).

Cisneros-Pérez *et al.* (2017) investigaram o efeito de dois tratamentos (térmico: fervura do inóculo, previamente desagregado, durante 15min. e *washout* celular: 10dias com TRH=8h) e do TRH (1–10h) na produção de bioH_2 , através da fermentação no escuro de glucose, em condições mesófilas (30°C), a pH 5,5. Os melhores resultados foram alcançados com o *washout* celular com uma taxa de produção de $7,70 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}_r^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e rendimento de $3,50 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ hexose. Os autores verificaram um aumento do desempenho do bio-reactor com a redução do TRH de 10 para 6h, com um ligeiro decréscimo de 6 para 4h e uma abrupta diminuição nos TRH's inferiores a 4h. Não ocorreu produção de CH_4 em nenhum dos ensaios, revelando a eficiência destes tratamentos na eliminação de bactérias metanogénicas em inóculos de natureza granular. O TRH pode assim ser utilizado como alternativa a outros tipos de tratamentos de enriquecimento em bactérias produtoras de bioH_2 , com redução dos custos associados à energia, no caso dos tratamentos térmicos, ou agentes químicos, no caso de tratamentos químicos.

Até à data foram reportados vários TRH's compatíveis com a produção de bioH_2 (1,0h–60d) (Alexandropoulou *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016b; Bharathiraja *et al.*, 2016). No entanto o TRH ótimo varia em função da composição do substrato (a taxa de hidrólise varia em função da sua biodegradabilidade), tipo de inóculo utilizado, carga aplicada, bem como do potencial redox (Ghimire *et al.*, 2015a; Babu *et al.*, 2009).

Dentro de um intervalo de tempo apropriado, o aumento do TRH pode resultar no aumento da capacidade das bactérias produzirem hidrogénio; contudo, valores demasiado elevados podem ter o efeito inverso por promoverem o desenvolvimento de bactérias hidrogenotróficas (Wang & Wan, 2004).

Segundo Paudel *et al.* (2017), a produção de bioH_2 encontra-se inversamente relacionada com o aumento do TRH, na medida em que com a diminuição do TRH ocorre o aumento da carga orgânica aplicada, aumentando o conteúdo de carbono no sistema com consequente aumento da produção de bioH_2 . O direccionamento da utilização de substrato do crescimento e manutenção celular para a produção de produtos finais também ocorre com a redução do TRH (Mohammadi, 2012). À medida que o TRH aumenta pode ocorrer o aumento do teor de hidrogénio no biogás, no entanto o rendimento de produção revela-se inferior (Mohammadi, 2012).

Salem *et al.* (2018) investigaram o efeito do TRH na fermentação no escuro de três substratos (água residual sintética contendo: sacarose, batata ou feijão). Para tal utilizaram um inóculo obtido a partir de uma estação de tratamento de águas residuais pré-tratado termicamente (100 °C, durante 2h) e testaram TRH's de 12, 18 e 24h. Utilizando sacarose e batata, verificou-se o aumento na taxa de produção de bioH₂ com o aumento do TRH; os melhores resultados foram de 4,40 e 2,53 L H₂.L_r⁻¹.d⁻¹, para sacarose e batata, respetivamente, para um TRH de 12h. Os autores justificam o resultado obtido em ambos os casos, pelo aumento da entrada de alimento fresco no bio-reator, associado à diminuição do TRH. Em contrapartida no ensaio onde foi utilizada a água residual contendo feijão, o comportamento foi inverso: obteve-se um aumento da taxa de produção com o aumento do TRH. O melhor resultado foi de 1,90 L H₂.L_r⁻¹.d⁻¹, com o TRH de 24h. A nível do rendimento de produção de bioH₂, nos ensaios em que se utilizou sacarose, ocorreu um aumento de 270 para 320 mL H₂.g⁻¹ SV, com a diminuição do TRH de 24 para 18h e redução do rendimento para 240 mL H₂.g⁻¹ SV, com a diminuição do TRH para 12h. Verificou-se a mesma tendência no ensaio realizado com batata onde se registou o aumento de 110 para 150 mL H₂.g⁻¹ SV, com os TRH's de 24 e 18h, respetivamente, e posterior redução para 140 mL H₂.g⁻¹ SV com o TRH de 12h. No caso do feijão, verificou-se novamente uma tendência oposta à dos outros dois substratos, com resultados de 80,0, 50,0 e 30,0 mL H₂.g⁻¹ SV, para valores de TRH de 24, 18 e 12h, respetivamente.

A discrepância entre resultados pode ter-se devido às diferenças entre os substratos utilizados. O TRH apresentou também influência no teor de bioH₂, presente no biogás. No caso da batata verificou-se o aumento do teor de bioH₂ com a diminuição do TRH, 45,0, 48,5 e 54,5% v/v, para os TRH's de 24, 18 e 12h. No caso da sacarose não ocorreu variação significativa: os valores variaram entre 42,5 e 46,3% v/v. No ensaio que utilizou feijão, a redução do TRH de 24 para 18h levou ao aumento do teor de bioH₂ de 44,0 para 52,7% v/v tendo-se obtido 52,3% v/v, com o TRH de 12h.

Alexandropoulou *et al.* (2018) investigaram a influência do pH e TRH na produção de bioH₂, utilizando resíduos alimentares. Para tal estudaram TRH's de 4, 6, 8 e 12h. A taxa de produção de biogás e bioH₂ aumentou com a redução do TRH, tendo-se obtido os melhores resultados para o TRH=4h (4,32 ± 0,08 L H₂.d⁻¹ e 7,03 ± 0,15 L biogás.d⁻¹). Em contrapartida, os melhores rendimentos, foram obtidos com os TRH's de 12 e 6h (96,3 ± 3,36 e 102 ± 3,71 L H₂.kg⁻¹ de resíduos, respetivamente), revelando a adequabilidade destes dois TRH's para a produção biológica de hidrogénio. Estes resultados indicam que à medida que o TRH diminui ocorre o aumento da eficiência de produção de bioH₂ e a diminuição da eficiência de remoção de glúcidos.

Palomo-Briones *et al.* (2017) investigaram o efeito de TRH's entre 6 e 24h no rendimento de produção de bioH₂, bem como na estrutura microbiana. Utilizaram lactose como substrato e os ensaios operaram a 37 °C e pH=5,9. Os melhores resultados obtidos foram os relativos ao THR=6h (2,00 L H₂.L⁻¹.d⁻¹ e 86,0 mol H₂.mol⁻¹ lactose). Quanto à estrutura microbiana, verificaram que com a aplicação de TRH's mais reduzidos (6 e 12h), a população era maioritariamente constituída por bactérias produtoras de bioH₂ (*Clostridiaceae*, *Lacnospiraceae* e *Enterobacteriaceae*) com a consequente obtenção de formato, acetato e butirato como produtos maioritários. Em contrapartida, com TRH's mais elevados (18 e 24h) obtiveram um enriquecimento em bactérias que competem com a produção de bioH₂ (*Sporolactobacillaceae* e *Streptococcaceae*), com lactato como produto maioritário.

Liu *et al.* (2016b) referem o TRH de 1h como ótimo na fermentação no escuro de águas residuais de produção de bebidas, a pH=5,5 e uma temperatura de 37 °C. Os autores verificaram um claro aumento na eficiência do processo fermentativo, tendo alcançado os melhores resultados com o THR=1h (11,4 ± 1,39 L H₂.L_r⁻¹.d⁻¹ e 0,30 ± 0,06 mol H₂.mol⁻¹ hexose). Resultados inferiores foram obtidos com TRH=4h (2,25 ± 0,58 L H₂.L_r⁻¹.d⁻¹ e 0,20 ± 0,06 mol H₂.mol⁻¹ hexose) e TRH=2h (4,27 ± 1,96 L H₂.L_r⁻¹.d⁻¹ e 0,23 ± 0,08 mol H₂.mol⁻¹ hexose).

É, no entanto, de ressaltar que um TRH demasiado baixo pode não ser suficiente para que os microrganismos processem o substrato (Mohammadi, 2012), podendo também ocorrer a eliminação da biomassa do bio-reactor (Wang & Wan, 2009).

As divergências de resultados entre os vários estudos podem ser devidas a diversas condições ambientais/operacionais, como o tipo de inóculo, substrato e intervalo de TRH's estudados (Wang & Wan, 2009).

1.2.1.2.4. Carga orgânica aplicada

A carga orgânica aplicada (CA) é um dos parâmetros operacionais mais importantes, sendo utilizado para investigar o efeito de determinada quantidade de um certo tipo de substrato, seja ele sintético ou real, no processo de fermentação no escuro. A produção de hidrogénio é fortemente afetada pela carga orgânica aplicada ao bio-reactor. Este parâmetro é dependente do TRH, bem como da concentração de matéria orgânica no substrato, influenciando as vias fermentativas, eficiência de conversão de substrato, a composição da população microbiana e consequentemente a produção de bioH₂ (Paudel *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2014; Mohammadi *et al.*, 2012).

É reportado em alguns estudos que uma carga orgânica aplicada elevada resulta no aumento do rendimento de produção de bioH₂ (Cisneros-Pérez *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Tawfik & Salem, 2012); no entanto, uma CA demasiado elevada pode ter um efeito inibidor na produção de bioH₂ através do favorecimento da atividade de bactérias produtoras de ácido láctico (Santos *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2010), bem como da ocorrência de inibição pelo substrato (Mohammadi *et al.*, 2012).

Este comportamento foi verificado por Hafez *et al.* (2010) num estudo onde foram testadas seis cargas orgânicas (entre 6,50 e 206 gCQO.L⁻¹.d⁻¹), para obtenção de bioH₂ em condições mesófilas. Foram alcançados elevados rendimentos de produção de bioH₂ até à carga de 103 gCQO.L⁻¹.d⁻¹. Com as cargas de 154 e 206 gCQO.L⁻¹.d⁻¹ verificou-se um declínio abrupto no rendimento de produção de bioH₂. Wang *et al.* (2016) observaram o mesmo comportamento na produção de bioH₂ a partir da fermentação no escuro de águas residuais contendo amido de milho. Estudaram um intervalo entre 10,0 e 20,0 g.L⁻¹ tendo obtido a produção máxima de bioH₂ de 2,17 LH₂.L⁻¹, com uma CA de 15,0 g(açúcares totais).L⁻¹ com uma redução drástica (<300 mLH₂.L⁻¹) com CA's superiores a esse valor.

Qiu *et al.* (2017) estudaram o efeito da CA (intervalo entre 2,50 e 15,0 g(xilose).L⁻¹) na produção biológica de bioH₂, a partir de xilose, a 70 °C e pH_{in}=7. As concentrações de 10,0 e 7,50g(xilose).L⁻¹ permitiram obter os melhores resultados em termos de volume cumulativo (314 mLH₂) e de rendimento (1,29 molH₂.mol⁻¹ xilose consumida) de bioH₂, respetivamente. As concentrações de 2,50, 12,5 e 15,0 g(xilose).L⁻¹ conduziram a rendimentos muito inferiores (<0,25, <1,00 e <0,75 molH₂.mol⁻¹ xilose consumida, respetivamente).

Paudel *et al.* (2017) investigaram o efeito da carga orgânica aplicada e do TRH, na produção contínua de bioH₂ e metano, utilizando um bio-reator CSTR a partir de uma mistura de resíduos orgânicos domésticos e águas castanhas (fezes sem urina). O pH foi controlado entre 5,0 e 5,5 e o bio-reator operou a 37 °C. O ensaio foi iniciado com um TRH=48h, que foi mantido até ser alcançada estabilidade (produção de gás e remoção orgânica sem flutuações significativas). O TRH foi posteriormente alterado para 24, 12 e 8h. A taxa de produção de biogás com TRH de 48h foi de 1,08 L.L_r⁻¹.d⁻¹ (CA=17,7 gSV.L⁻¹.d⁻¹), com um teor de bioH₂ associado de 27,9% v/v, tendo aumentado para 1,35 L.L_r⁻¹.d⁻¹ e 32,3% v/v, com a redução do TRH para 8h (CA=106 gSV.L⁻¹.d⁻¹). Foi observado que um aumento da CA, obtido através da diminuição do TRH, teve um efeito significativo no aumento do teor de bioH₂ e na taxa de produção.

Lin *et al.* (2016) estudaram a influência da CA na produção de bioH₂. Utilizaram um TRH de 8h, temperatura de 35 °C, pH=5,6 e um intervalo de concentrações entre 10 e 40 g(açúcares totais).L⁻¹. O teor de bioH₂ no biogás aumentou progressivamente até à concentração de 30 g(açúcares totais).L⁻¹ até 48% v/v, não tendo aumentado a partir desta concentração. O pico da

taxa de produção ($20 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}_r^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) foi atingido na concentração máxima ($40 \text{ g(açúcares totais)} \cdot \text{L}^{-1}$), no entanto o rendimento mais elevado ($1,53 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ hexose}$) foi atingido com a concentração de $20 \text{ g(açúcares totais)} \cdot \text{L}^{-1}$.

Pode-se constatar que não existe um intervalo ótimo definitivo para a produção biológica de hidrogénio, podendo ser encontrados resultados contraditórios para um mesmo intervalo, dada a divergência de outros fatores, como tipo de substrato, inóculo, pH, TRH, temperatura, entre outros (Mohammadi *et al.*, 2012; Wang & Wan, 2009).

Os diferentes parâmetros operacionais devem ser otimizados, de modo a obter-se uma produção e eficiência mais elevadas, sendo sugerido por Mohammadi *et al.* (2012) que se proceda a uma aclimatização gradual prévia dos microrganismos à carga em questão, até alcançar o valor final desejado.

1.2.1.2.5. Tipo de substrato

O tipo de substrato influencia não só o desempenho do sistema, mas também a estrutura da comunidade microbiana e o seu metabolismo. Embora tenham vindo a ser estudados vários tipos de substratos para a produção de bioH_2 , a maioria dos estudos utiliza substratos modelo, como a glucose, xilose e a sacarose (Xiao *et al.*, 2013), cuja aplicação em larga escala é pouco sustentável, dos pontos de vista ambiental e económico (García Depraect *et al.*, 2017).

A escolha de substratos de baixo custo (como por exemplo, resíduos sólidos urbanos, resíduos agrícolas e águas residuais) é de capital importância para a manutenção da viabilidade económica do processo (García-Depraect *et al.*, 2017). Para além da vantagem financeira, a utilização de resíduos reduz a competição pelos glúcidos de primeira geração que são utilizados para fins alimentares (Silva-Illanes *et al.*, 2017).

O processo de co-digestão é uma abordagem interessante que pode ser utilizada para a obtenção de um maior equilíbrio nutricional (evitando a utilização de suplementação com micro e macronutrientes), redução de toxicidade e favorecimento da capacidade tampão, quando utilizados substratos complementares. García-Depraect *et al.* (2017) investigaram o potencial de produção de bioH_2 a partir da co-digestão de águas residuais, do processo de produção de "tequila", e uma água obtida a partir de cozedura de milho (*Nejayote*), nas razões de 0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 e 100/0. A mono-digestão de cada um dos substratos não resultou na produção de bioH_2 , tendo a co-digestão dos mesmos possibilitado a obtenção de elevados rendimentos e taxas de produção de bioH_2 , com os melhores resultados atribuídos à razão 80/20 ($115 \text{ mLH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}_{\text{ad.}} \cdot \text{h}^{-1}$, $107 \text{ mL H}_2 \cdot \text{L}_r^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). A utilização de um co-substrato permitiu ainda uma poupança de volume da base adicionada, para controlo de pH, na ordem dos 46,0%.

Muitos dos resíduos facilmente disponíveis e de baixo custo, como é o caso dos resíduos lenhocelulósicos, têm a desvantagem de ser parcamente biodegradáveis, sendo necessário recorrer à aplicação de pré-tratamentos, de modo a contribuir para o aumento da sua biodisponibilidade (Salem *et al.*, 2018; Ghimire *et al.*, 2015a). Existem vários tipos de pré-tratamentos, como a redução do tamanho das partículas, de modo a aumentar a área superficial (moagem, trituração, entre outros.), térmicos, radiação (raios gama ou micro-ondas), químicos (ácidos, alcalinos) e oxidativos (H_2O_2 ou ozono), entre outros, podendo utilizar-se também mais do que um método em simultâneo (Ghimire *et al.*, 2015a).

Salem *et al.* (2018) estudaram o efeito de vários pré-tratamentos na produção de $bioH_2$ a partir de uma água residual sintética, contendo batata e outra contendo feijão. Para tal submeteram os substratos a tratamentos térmicos (100 °C, durante 30min.), ácidos e alcalinos (5% HCl e NaOH (2N), até pH 4 e 10, respetivamente), ultrassons durante 30min., adição de 3 mL $H_2O_2 \cdot L^{-1}$ substrato e combinações entre os vários métodos. Testaram posteriormente o potencial de produção de $bioH_2$ de cada um dos substratos. Todos os ensaios tiveram melhores resultados do que os testes de controlo (sem tratamento), tendo o tratamento oxidativo sido o mais favorável, com 940 mL H_2 a partir da água residual contendo batata e 470 mL H_2 para o substrato contendo feijão.

1.2.1.2.6. Inóculo

Uma das principais limitações da produção biológica de hidrogénio, através de fermentação no escuro a partir de resíduos, prende-se com a falta de microrganismos passíveis de aplicação industrial (García-Depraect *et al.*, 2017).

Podem ser utilizadas culturas mistas, co-culturas de bactérias identificadas ou culturas puras.

Embora se tenham vindo a obter rendimentos de produção de $bioH_2$ relativamente elevados com a aplicação de culturas puras, a sua utilização não é considerada exequível à escala industrial (Bundhoo & Mohee, 2016; Ghimire *et al.*, 2015a) por terem elevados custos associados, tanto na aquisição, como na manutenção de condições de assepsia (Bundhoo & Mohee, 2016).

Sinha *et al.* (2016) estudaram o efeito da utilização de uma co-cultura (*Klebsiella pneumoniae* + *Clostridium acetobutylicum*) e culturas puras de cada uma das espécies, na produção de $bioH_2$ através de fermentação no escuro de glucose, melado de cana (constituintes principais: glucose, frutose e sacarose), águas residuais ricas em amido e um efluente de destilaria. A co-cultura demonstrou ser sempre mais eficiente do que as culturas puras em termos de produção de $bioH_2$, tendo possibilitado o aumento no rendimento de produção deste gás em 37% v/v e 18% v/v, respetivamente, comparativamente com a utilização das culturas puras. Os autores realçam que

as culturas mistas e co-culturas têm o potencial de produção de uma maior variedade de enzimas que poderão ser favoráveis à conversão dos substratos.

As culturas mistas permitem a utilização de uma maior variedade de substratos e de uma mais elevada complexidade, na medida em que é requerida a utilização de um consórcio alargado de microrganismos para a sua hidrólise (Bundhoo & Mohee, 2016; Qiu *et al.*, 2017; Sinha *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2015a). No entanto, a utilização de culturas mistas apresenta alguns constrangimentos. Na sua constituição estão presentes microrganismos produtores de hidrogénio e alguns microrganismos menos desejáveis (dado o seu potencial de redução do rendimento de produção de bioH₂, tanto pelo consumo de H₂ e de substrato, como pelo desvio das vias metabólicas do sentido da produção de bioH₂), sendo desejável a aplicação de algum tipo de pré-tratamento ao inóculo para seleção e enriquecimento em bactérias produtoras de H₂ (Ghimire *et al.*, 2015a).

Os principais responsáveis pela diminuição da performance do processo de fermentação no escuro são as bactérias **metanogénicas hidrogenotróficas, redutoras de sulfato, redutoras de nitrato, homoacetogénicas, produtoras de propionato, e lácticas** (Bundhoo & Mohee, 2016).

A maioria das bactérias consumidoras de H₂ são **metanogénicas** (Guo *et al.*, 2010), utilizando esta molécula como dador de eletrões aquando da redução de CO₂ a CH₄, levando automaticamente à diminuição do rendimento de produção de bioH₂, quando presentes no inóculo utilizado (Bundhoo & Mohee, 2016). Existem algumas formas de inibição da atividade deste tipo de bactérias: a aplicação de inibidores químicos como o 2-bromoetanosulfonato (BESA), acetileno e clorofórmio, controlo do pH (pH<5,5), aplicação de pré-tratamento térmico para enriquecer o meio em bactérias esporulantes. A aplicação de TRH's reduzidos também é utilizado para a eliminação de bactérias metanogénicas (Guo *et al.*, 2010).

As **bactérias redutoras de sulfato** são bactérias anaeróbias obrigatórias que têm o potencial de conversão de sulfatos a sulfuretos (H₂S, HS⁻ e S₂⁻). Existem vários tipos de bactérias redutoras de sulfato, de entre elas as que têm maior impacto no processo de fermentação no escuro são as consumidoras de hidrogénio, visto que utilizam a maior parte do H₂ produzido como dador de eletrões para a síntese de sulfuretos, resultando na diminuição dos rendimentos de produção de H₂. Para além disto, existe ainda o risco de ocorrência de inibição do processo, dada a toxicidade associada aos sulfetos, principalmente na forma de H₂S vista a sua capacidade de penetração na membrana celular, acompanhada de cessação das funções celulares (Bundhoo & Mohee, 2016). É referida a vantagem que este grupo de bactérias tem sobre as homoacetogénicas e as bactérias produtoras de H₂, sendo extremamente eficientes mesmo na presença de reduzidas concentrações de H₂ (0,02 ppm). As melhores estratégias para controlar a

sua atividade passam pela escolha de substratos pobres em sulfatos e pela manutenção de um pH<6,0 (Guo *et al.*, 2010)

Quanto às **bactérias redutoras de nitratos**, estas podem ser tanto autotróficas como heterotróficas. De entre elas, apenas as autotróficas desnitrificantes são consideradas danosas para o processo de fermentação no escuro, tanto pela a sua capacidade de utilizar o H₂ como dador de eletrões para produção de amónia, como pelo efeito inibitório que este produto tem a nível da atividade das bactérias produtoras de hidrogénio (Bundhoo & Mohee, 2016).

As **bactérias homoacetogénicas** são um grupo de bactérias estritamente anaeróbias. Alguns exemplos de membros deste grupo são as espécies *Clostridium aceticum* e *Clostridium thermoaceticum* (Guo *et al.*, 2010). Estes microrganismos podem ser autotróficos (–utilizam H₂ como dador de eletrões na redução de CO₂ a acetato, reduzindo o rendimento de produção de H₂, de forma direta), heterotróficos (–utilizam substratos orgânicos para produzir acetato, tornando-os menos disponíveis para as bactérias produtoras de H₂), ou mixotróficos (–são consumidoras tanto de H₂ como de substratos orgânicos). A acumulação de acetato no meio pode ainda ter um efeito inibidor no processo de fermentação no escuro sendo relatado que pode levar a uma redução da produtividade de bioH₂ entre 45–90% (Palomo-Briones *et al.*, 2017; Bundhoo & Mohee, 2016). Uma estratégia utilizada para controlar este grupo de bactérias passa pela remoção do CO₂ do *headspace* do bio-reator, visto que a aplicação de pré-tratamentos para seleção de microrganismos esporulantes não é viável, na medida em que muitas das bactérias homoacetogénicas pertencem ao género *Clostridium* (Guo *et al.*, 2010).

As **bactérias produtoras de propionato** também têm o potencial de redução da eficiência do processo de fermentação no escuro de forma direta e indireta. Este grupo de bactérias produz propionato a partir de glucose, utilizando o bioH₂ como dador de eletrões, ou a partir de lactato, com consumo de NADH no processo, prejudicando assim a síntese de bioH₂. O propionato acumulado no meio pode também afetar negativamente a atividade das bactérias produtoras de hidrogénio (Bundhoo & Mohee, 2016).

As **bactérias lácticas** são um grupo de bactérias comumente encontradas em inóculos utilizados para fermentação no escuro, incluindo-se neste grupo bactérias das famílias *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, entre outras (Palomo-Briones *et al.*, 2017). Estas bactérias realizam a fermentação de substratos ricos em glúcidos, nucleotídeos e aminoácidos, com obtenção de ácido láctico como principal produto, originando algumas toxinas durante o processo. Assim, a presença deste tipo de bactérias, em culturas mistas, pode ter um efeito prejudicial no rendimento de produção de bioH₂, tanto através da competição direta pelo substrato como pela produção de toxinas que têm um efeito inibidor nas bactérias produtoras de bioH₂ (Palomo-Briones *et al.*, 2017; Bundhoo & Mohee, 2016).

As principais estratégias utilizadas para restringir a atividade das bactérias indesejadas, que se encontram presentes no inóculo, bem como favorecer as bactérias produtoras de hidrogénio, consistem na aplicação de pré-tratamentos ao inóculo. A utilização de pré-tratamentos tem por base a natureza esporulante de uma considerável parte das bactérias produtoras de hidrogénio. Estes organismos têm a capacidade de produzir esporos quando sujeitos a condições ambientais adversas, geralmente condições extremas de pH, temperatura, radiação, entre outras. Os esporos germinam quando as condições do meio voltam a ser favoráveis. É de ressaltar que nem todas as bactérias produtoras de hidrogénio são esporulantes e que nem todas as não produtoras são não esporulantes. Deste modo, aquando da aplicação dos pré-tratamentos pode ocorrer a eliminação de algumas bactérias produtoras de hidrogénio (prejudicando o rendimento de bioH_2) e a sobrevivência de algumas bactérias hidrogenotróficas e lácticas.

O tipo de pré-tratamento influencia a regulação do tempo da fase *lag* (tempo de germinação de esporos) das bactérias produtoras de hidrogénio, podendo levar à redução ou aumento dos rendimentos e taxas de produção de bioH_2 . Num estudo levado a cabo por Ghimire *et al.* (2015b) foi avaliado o efeito de três tipos de pré-tratamento no potencial biológico de hidrogénio, a partir de uma mistura de batata com abóbora através do processo de fermentação no escuro, a 35 °C e sem controlo de pH ($\text{pH}_{\text{in}}=7,4$). Os tratamentos estudados foram os seguintes: químico, com BESA (25 mM), térmico (4h, em estufa a 105 °C) e arejamento (10 dias com fluxo de ar 100 L(ar).kg⁻¹(lama).h⁻¹). Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento químico, com um rendimento de produção de bioH_2 de $171 \pm 7 \text{ mLH}_2\cdot\text{g}^{-1} \text{ SV}$ (fase *lag* com a duração de 14,4h). Com a aplicação dos tratamentos térmico e arejamento, os autores obtiveram os rendimentos correspondentes a $44,9 \pm 7$ e $82,4 \pm 15 \text{ mLH}_2\cdot\text{g}^{-1} \text{ SV}$, respetivamente, e fases *lag* com a duração de 61,1 e 37,4h, respetivamente. Nos ensaios onde foi aplicado o tratamento químico foram obtidas quantidades vestigiais de CH_4 , enquanto que com os restantes tratamentos se obteve cerca de 25% v/v.

A eficiência do pré-tratamento varia em função do tipo de inóculo (Kumar *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2015b). Kumar *et al.* (2016) estudaram a importância do pH, aplicação de pré-tratamento ao inóculo e escolha do tipo de inóculo, na produção de bioH_2 através de fermentação no escuro. O pH foi controlado a 5,5 e foram utilizados dois inóculos diferentes, um inóculo termófilo e um mesófilo ambos pré-tratados termicamente (100 °C, durante 24h). Nos ensaios onde foi utilizado o inóculo mesófilo foi registada a produção de CH_4 (32,5–63,2% v/v), enquanto que nos ensaios realizados com o inóculo termófilo não foi detetada a presença de CH_4 .

Embora Bundhoo & Mohee (2016) refiram o pré-tratamento térmico como a escolha mais eficaz na eliminação de bactérias lácticas, Ghimire *et al.* (2015b) realçam que este tipo de tratamento requer um grande dispêndio energético, não sendo o mais indicado para aplicação em larga

escala, devendo a escolha do tipo de pré-tratamento ter em consideração os custos associados ao processo.

1.3. OBJETIVOS DA PRESENTE DISSERTAÇÃO

A presente dissertação teve como principal objetivo averiguar o efeito do valor de pH (4,0, 6,0 e 7,0) na produção de bioH_2 , por via da fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*) de casca de batata (resíduo de uma indústria de aperitivos).

Para se atingir o principal objetivo o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Recolha e caracterização físico-química da casca de batata;
- Ensaio de fermentação anaeróbia no escuro, com diferentes valores de pH;
- Caracterização físico-química do afluente e efluente do digestor anaeróbio;
- Quantificação e caracterização do biogás: medição do volume e quantificação dos teores de CO_2 e H_2 ;
- Cálculo dos parâmetros de eficiência de remoção de matéria orgânica e de rendimento de produção de bioH_2 .

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho decorreu entre os meses de Março e Maio de 2015, nos laboratórios do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa (DCTB) e do Departamento de Química (DQ), da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT–UNL).

O trabalho experimental realizou-se em duas etapas, as quais serão descritas seguidamente:

1. Caracterização físico-química do substrato orgânico (casca de batata);
2. Ensaios de fermentação anaeróbia.

2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE BATATA

A casca de batata, utilizada neste trabalho, foi facultada por uma indústria de aperitivos, sendo esta um resíduo do processo de produção.

O resíduo apresentou-se sob a forma de pequenos fragmentos de casca com pequenas partículas de amido (polpa de batata) (fig. 2.1). Após a recolha, o resíduo foi transportado para o laboratório, acondicionado em sacos de aproximadamente 200 g, cada um, e congelado à temperatura de -18 °C, com o objetivo de se mitigar a sua degradação biológica.

Antes de cada utilização, o resíduo era descongelado durante a noite, à temperatura ambiente.



Figura 2.1 - Resíduo de casca de batata (substrato orgânico) utilizado nos ensaios de fermentação.

2.1.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade presente na casca de batata consiste na fração da amostra que sofre evaporação a 105 ± 1 °C.

A casca de batata foi seca em caixas de *petri*, sem tampa, em estufa (*Memmert, UI5*), a 105 ± 1 °C. A secagem foi realizada até o material alcançar um peso constante (variação de massa, entre pesagens, inferior a 5%). A casca de batata era arrefecida num exsicador e pesada, em balança de precisão ($\pm 0,1$ g) (*KERN*). O cálculo do teor de humidade realizou-se através da equação 8:

$$h_{bh} = \frac{P_1 - (P_2 - P_0)}{P_1} \times 1000 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde,

h_{bh} : Teor de humidade na base húmida (g. kg⁻¹ bh)

P_0 : Tara da placa de *petri* a 105 ± 1 °C (g)

P_1 : Massa de amostra húmida (g)

P_2 : Massa de amostra seca + tara da placa de *petri* a 105 ± 1 °C (g)

2.1.2. Determinação do teor de sólidos

2.1.2.1. Sólidos totais

Os sólidos totais (ST) correspondem à fração sólida que permanece na amostra, após secagem a 105 ± 1 °C, até peso constante (variação de massa, entre pesagens, inferior a 5%). O seu valor foi calculado através da equação 9:

$$ST_{bh} = \frac{P_2 - P_0}{P_1} \times 1000 \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde,

ST_{bh} : Teor de sólidos totais na base húmida (g. kg⁻¹ bh)

P_0 : Tara da placa de *petri* 105 ± 1 °C (g)

P_1 : Massa de amostra húmida (g)

P_2 : Massa de amostra seca + tara da placa de *petri* 105 ± 1 °C (g)

2.1.2.2. Sólidos fixos (cinzas)

Os sólidos fixos (SF), também designados por cinzas, consistem na fração dos ST que permanece na forma de cinzas, após calcinação a 550 ± 50 °C. Esta fração corresponde maioritariamente à parte inorgânica e mineral presente na matéria orgânica (MO).

As amostras, após desidratação, foram introduzidas em cadinhos de fibra de vidro, previamente tarados a 550 ± 50 °C e calcinadas em mufla micro-ondas (CEM, MAS 7000), durante 60min. Após arrefecimento das amostras, num exsiccador contendo sílica gel desidratada, procedeu-se à sua pesagem numa balança analítica (precisão de $\pm 0,0001$ mg) (Denver Instruments Company, TR-204).

O teor de SF foi calculado recorrendo-se à equação 10:

$$SF_{bh} = \frac{P_4 - P_3}{P_1} \times 1000 \quad (\text{Eq.10})$$

Onde,

SF_{bh} : Teor de sólidos fixos (g. kg⁻¹ bs)

P_1 : Massa de amostra húmida (g)

P_3 : Tara do cadinho a 550 ± 50 °C (g)

P_4 : Massa de cinzas + tara do cadinho a 550 ± 50 °C (g)

2.1.2.3. Sólidos voláteis

Considera-se como sólidos voláteis (SV) a fração dos ST que sofre volatilização a 550 ± 50 °C. Correspondem principalmente à fração orgânica que, ao sofrer oxidação térmica, é libertada sob a forma de gases, maioritariamente CO₂.

O procedimento para a determinação deste parâmetro foi o mesmo que para os SF (ver 2.1.2.2).

Esta fração foi quantificada a partir da equação 11:

$$SV_{bh} = \frac{P_5 - P_4}{P_1} \times 1000 \quad (\text{Eq.11})$$

Onde,

SV_{bh} : Teor de sólidos voláteis na base húmida (g. kg⁻¹ bh)

P_1 : Massa de amostra húmida (g)

P_4 : Massa das cinzas + tara do cadinho a 550 ± 50 °C (g)

P_5 : Massa de amostra seca + tara do cadinho a 550 ± 50 °C (g)

2.1.3. Determinação da CQO

A carência química de oxigénio (CQO) é um parâmetro que permite quantificar a matéria orgânica (biodegradável e não biodegradável) presente numa amostra. Realiza-se por oxidação química, com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) (agente oxidante), a quente e em meio ácido. O

agente oxidante, de normalidade conhecida, é adicionado em excesso, em relação à matéria orgânica. A quantidade que não reage com a matéria orgânica é quantificada posteriormente através da sua titulação com sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$), de normalidade conhecida, na presença do indicador ferroína (*Sigma–Aldrich*). No presente trabalho utilizou-se o ácido sulfúrico (H_2SO_4) (>95% v/v) (*Fisher chemical*) como agente acidificante e sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$)(0,5N) (*Panreac*) como indicador.

As determinações foram realizadas em quintuplicado, contendo diferentes massas de casca de batata seca e triturada (**massas iniciais de:** $0,008 \pm 0,003$ g). As amostras foram introduzidas em tubos de digestão, aos quais se adicionou 20 mL de H_2SO_4 (>95% v/v), 10 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1N), esferas de vidro para regulação de ebulição e sulfato de mercúrio (II) (HgSO_4) (*Chem-lab*). A utilização deste último reagente teve por objetivo a precipitação dos cloretos eventualmente presentes na amostra, de modo a que estes não interferissem na oxidação do dicromato de potássio. Realizou-se também um ensaio em branco, cuja composição diferiu apenas pela ausência de amostra.

As amostras foram digeridas num termo-reator (*Behr Labor–Technick*) a 160 °C, durante 60min. Após arrefecimento procedeu-se à sua titulação com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (0,5N), até a solução mudar a sua cor de amarelo para vermelho. O volume gasto na titulação foi utilizado para o cálculo da CQO total (CQOt), tendo sido o resultado expresso em quantidade de oxigénio que seria necessária para oxidar a matéria orgânica, por unidade de massa de amostra submetida a oxidação.

A CQOt foi calculada recorrendo às equações 12 e 13:

$$T = \frac{N_{\text{dicromato}} \times V_{\text{dicromato}}}{V_{\text{titulante}}} \quad (\text{Eq.12})$$

$$CQOt = \frac{\left(\frac{V_{t,b} - V_{t,a}}{m_a} \times K_1 \times T \right)}{1000} \quad (\text{Eq.13})$$

Onde,

T: Título (N)

N_{dicromato}: Normalidade do dicromato (N)

V_{dicromato}: Volume do dicromato (mL)

V_{titulante}: Volume de titulante (mL)

CQOt: Carência química de oxigênio (g O₂. kg⁻¹)

V_{t,b}: Volume de titulante gasto no branco (mL)

V_{t,a}: Volume de titulante gasto na amostra (mL)

K₁: Valor constante = 8000mgO₂. L⁻¹

m_a: Massa de amostra (g)

2.1.4.Determinação do azoto *kjeldahl*

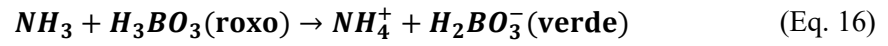
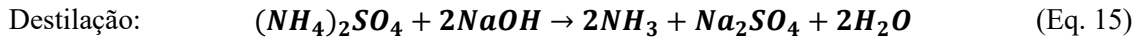
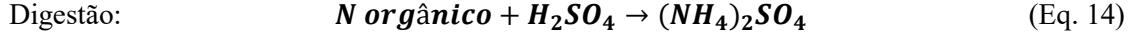
O parâmetro azoto kjeldahl (TKN – “total kjeldahl nitrogen”) consiste na quantificação dos teores de azoto amoniacal e azoto orgânico presentes numa amostra.

Para a determinação deste parâmetro realizou-se a digestão ácida, a quente, de três amostras de casca de batata desidratada (valor médio da massa: 0,146 ± 0,095 g), num termo-reator (*Velp Scientific*). Para tal, colocou-se cada uma das massas de amostra num tubo de digestão contendo 30 mL de H₂SO₄ (>95% v/v), mistura catalisadora (selénio negro e sulfato de potássio na proporção de 1:100 m/m) e esferas reguladoras de ebulição. A digestão deu-se a uma temperatura de 360 °C, durante três horas. Nesta etapa dá-se a redução do azoto orgânico a ião amónio, ficando este último retido em solução sob a forma de sulfato de amónio. Foi realizado um ensaio em branco, cuja composição diferiu da anterior apenas pela ausência de amostra.

Depois de arrefecido, o digerido foi filtrado, com o auxílio de filtros de fibra de vidro (porosidade: 1 µm), (*Filters Fioroni*), para balões volumétricos aos quais se adicionou água ultrapura (*Millipore, Milli Q Academic*) até se perfazer um volume de 50 mL. Transferiram-se depois três volumes do digerido (10, 30 e 50 mL) para tubos de digestão aos quais se adicionou água ultrapura, até perfazer um volume de 100 mL, e cinco gotas de fenolftaleína. O meio foi fortemente alcalinizado, com hidróxido de sódio (NaOH) (6N), até a cor mudar para rosa forte (pH entre 8 e 10). Posteriormente procedeu-se à destilação do digerido, numa unidade de destilação (*Kjeltec System 1002 Distilling Unit Tecator*). O destilado foi recolhido num matraz contendo 50 mL de solução de ácido bórico e 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico. O objetivo desta etapa consistiu no arrastamento do amoníaco, através de uma corrente de vapor, e a sua fixação na solução de ácido bórico sob a forma de NH₄⁺.

Para a quantificação do teor de TKN procedeu-se à titulação do destilado, com H_2SO_4 (0,02N), até ocorrer alteração da cor verde para roxo.

As reações químicas que ocorrem nas etapas da digestão, destilação e titulação encontram-se identificadas como 14, 15, 16 e 17, respetivamente.



O valor do volume gasto na titulação foi utilizado para o cálculo da concentração do TKN, presente no digerido, com recurso à equação 18:

$$N_{digerido} = \frac{(V_{t,a} - V_{t,b}) \times K_2}{V_d} \quad (\text{Eq. 18})$$

Onde,

$N_{digerido}$: Concentração de azoto presente no digerido (mg N. L⁻¹)

$V_{t,a}$: Volume de titulante gasto na amostra (mL)

$V_{t,b}$: Volume de titulante gasto no branco (mL)

V_d : Volume de digerido utilizado na destilação (mL)

K_2 : Valor constante = **280 (adi.)**

A massa de TKN presente no digerido foi calculada através da equação 19:

$$m_{TKN_{digerido}} = \frac{N_{digerido} \times V_b}{1000} \quad (\text{Eq. 19})$$

Onde,

$m_{NTK_{digerido}}$: Massa de TKN presente no digerido (mg N)

$N_{digerido}$: Concentração de azoto presente no digerido (mg N.L⁻¹)

V_b : Volume do balão(mL)

A concentração de TKN presente no resíduo (bs) foi calculada com base na equação 20:

$$N_{resíduo} = \frac{m_{NTK_{digerido}}}{P_6} \quad (\text{Eq. 20})$$

Onde,

$N_{resíduo}$: Concentração de TKN na casca de batata (mg N.g⁻¹ bs)

$m_{TKN_{digerido}}$: Massa de TKN presente no digerido (mg N)

P_6 : Massa de amostra seca (g)

2.1.5.Determinação do fósforo total

A quantificação do fósforo total (P-total) foi realizada com recurso ao método espectrofotométrico.

Para se preparar um volume de 200 mL de agente redutor, adicionou-se num balão volumétrico, 100 mL de H₂SO₄ (5N), 30 mL de molibdato de amónio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O) (32 mM) (*Riedel-de Häen*), 1,056 g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) (176,13N) (*Fisher Chemical*), 10 mL de tartarato de potássio (K₂C₄H₄O₆.0,5H₂O) (9 mM.L⁻¹) (*Merck*) e fez-se o volume com água desionizada. Para se preparar 100 mL de solução padrão de fosfatos, adicionou-se a um balão volumétrico, 2 mL de solução *stock* de fosfatos (1,6 mM) e completou-se o volume com água desionizada (*Millipore, Elix 5*).

A construção da reta de calibração (*Absorvância (y) vs Massa de fósforo (x)*) efetuou-se com base na leitura da absorvância de padrões de fósforo, de concentração conhecida (1,6 mM.L⁻¹), a um comprimento de onda de 880 nm, num espectrofotómetro UV-Vis (*Shimadzu UV-120-11*). Para a preparação dos padrões utilizou-se 0, 10, 15, 20 e 25 mL da solução padrão previamente preparada, aos quais se adicionou 8,0 mL de solução redutora e água ultrapura até se perfazer um volume de 100 mL. Aguardou-se o desenvolvimento de cor azul, durante 15 min, e procedeu-se à leitura da absorvância a 880 nm, no espectrofotómetro, referido anteriormente.

Para determinar o P-total procedeu-se à digestão ácida das amostras de casca de batata com H₂SO₄ (>95% v/v). O procedimento foi o mesmo realizado para a determinação do TKN,

(secção 2.1.4). Para a leitura da absorvância das amostras colocou-se um volume de 2,50 mL de cada uma das amostras resultantes da digestão, em balões volumétricos de 100 mL, aos quais se adicionou três gotas de fenolftaleína e NaOH (6N) (*Panreac*) até ocorrer mudança de coloração para rosa forte (pH entre 8 e 10). Adicionou-se de seguida 8 mL de solução redutora e perfeitou-se o volume com água ultrapura. Deixou-se desenvolver cor azul, durante 15 min, e leu-se a absorvância a 880 nm.

Os valores das massas de fósforo total presente nas amostras digeridas (P_{bs}) foi calculado a partir da equação da reta de calibração obtida:

O cálculo da concentração de fósforo realizou-se com base na equação 21:

$$P - total_{bs} = \frac{\left(\frac{M_p \times V_b}{V_d}\right)}{P_6} \quad (\text{Eq. 21})$$

Onde,

$P - total_{bs}$: Concentração de P – total na base seca ($\mu\text{g P} \cdot \text{g}^{-1} \text{bs}$)

M_p : Massa de fósforo presente na amostra (μg)

V_b : Volume do balão (mL)

V_d : Volume de digerido utilizado na destilação (mL)

P_6 : Massa da amostra seca (g)

2.1.6. Caracterização elementar

A caracterização elementar consiste na determinação dos teores de C, N, S, O e H presente numa amostra ausente de humidade.

Esta determinação foi realizada no Departamento de Química da FCT–UNL com recurso a um analisador elementar (*Thermo Finnigan–CE Instruments Flash EA 1122 CHNS series*).

Os elementos C, H e N foram determinados conforme a norma ASTM D5373. O elemento S foi determinado de acordo com a norma ASTM D4239. O elemento O foi quantificado por diferença para 100% ($O = 100 - C - H - N - S - \text{cinzas}$).

2.2. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Os ensaios de fermentação anaeróbia tiveram como objetivo avaliar o efeito de três valores de pH (4, 6 e 7) no rendimento de produção de bioH_2 , produzido através da fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*) da casca de batata. Os ensaios serão denominados por E.4, E.6 e

E.7, respetivamente. Durante cada ensaio fez-se variar apenas o valor de pH, mantendo-se constante o tempo de retenção hidráulico (TRH=6d), a carga orgânica aplicada no fermentador ($10 \text{ gCQOt.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e a temperatura 37°C .

Antes do início dos ensaios realizou-se um tratamento térmico ao inóculo (lama de um digestor anaeróbio termófilo que produz biogás a partir da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos), com o objetivo de se eliminar as bactérias metanogénicas hidrogenotróficas (secção 3.2.2). Introduziu-se azoto puro (N_2) no interior do digestor, para assegurar condições de anaerobiose.

Para cada valor de pH foi realizado um ensaio. Durante a mudança de valores de pH, a adaptação da população microbiana às novas condições de pH foi realizada com dois tempos de retenção, antes de se considerar que o sistema se encontrava em equilíbrio dinâmico.

Em cada ensaio eram realizadas três alimentações (com intervalo de dois dias entre alimentações consecutivas). O substrato fornecido era previamente acidificado com ácido clorídrico (HCl) (1N), até se atingir um pH próximo do valor desejado para cada ensaio. O volume de substrato fornecido foi de 0,7 L, em cada uma das alimentações, para todos os ensaios. O resíduo foi sempre sujeito a pré-tratamentos termoquímicos (secção 3.2.3) para aumentar a sua biodisponibilidade, visto tratar-se de um substrato de difícil degradação biológica.

O registo dos valores de pH e potencial redox foram realizados sempre antes e depois de cada alimentação. O volume de biogás produzido foi registado através de medições com uma frequência bi-diária, exceto aos fins-de-semana.

Realizou-se a manutenção do pH pretendido em cada um dos ensaios com o auxílio de uma bomba peristáltica de ácido/base automática, programada para bombear HCl (1N) ou NaOH (1N) sempre que ocorressem oscilações de pH no interior do bio-reator, relativamente ao valor de pH a testar.

Foram colhidas e analisadas amostras de biogás, bem como do substrato afluente e do efluente, em todos os ensaios.

2.2.1. Bio-reator

No presente trabalho utilizou-se um reator biológico, em vidro, com um volume útil de 2,1 L e completamente misturado. A mistura é realizada por agitação mecânica com um sistema de pás (*propellers*). A figura 2.2 apresenta os componentes do bio-reator.

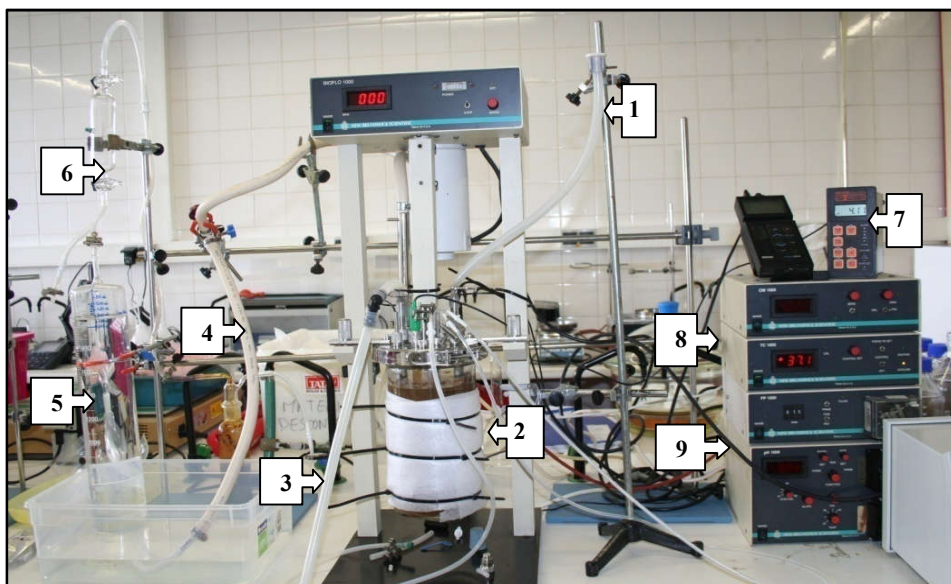


Figura 2.2 - Bio-reator anaeróbio de mistura completa. Legenda: Linha de entrada de afluente (1); Reator anaeróbio, em vidro com cinta de aquecimento, material de isolamento, sistema de agitação interna por pás e tampa com fixação de elétrodos e tubagens (2); Linha de saída do efluente (3); Linha de saída de gás (4); Coluna de vidro graduada (5); Ampola de vidro para colheita de amostras de gás (6); Controlador de pH (7); módulos de controlo digital da T (8); módulo de leitura do potencial redox (9).

O bio-reator operou em condições mesófilas (37 ± 1 °C), na ausência de oxigénio. A manutenção da temperatura foi realizada com o auxílio de uma cinta de aquecimento que se encontrava colocada em torno das paredes do bio-reator.

O módulo de controlo digital permitiu que se efetuasse a monitorização da temperatura, pH e potencial redox no interior do bio-reator, através de um termopar, de um elétrodo de pH e de elétrodo de potencial redox, respetivamente. O módulo de controlo do pH encontrava-se ligado a uma bomba de ácido/base que bombeava HCl (1N) ou NaOH (1N), caso ocorresse aumento ou diminuição de pH, em relação ao pH pretendido em cada ensaio.

O biogás produzido era recolhido numa coluna de vidro graduada, com uma capacidade máxima de 2275 mL. A coluna de vidro de recolha do biogás encontrava-se preenchida com água desionizada acidificada (pH=2), por forma a reduzir a solubilização de CO₂ e H₂S no líquido.

2.2.2. Inóculo

O inóculo utilizado no presente trabalho consistiu numa cultura mista, recolhida de um bio-reator anaeróbio da Estação de Tratamento e Valorização Orgânica (ETVO), da *Valorsul*. Este bio-reator opera em condições termófilas (temperatura média de 52 °C), sendo alimentado com a fração orgânica de resíduos sólidos urbanos.

A utilização de culturas mistas, para produção de bioH₂, requer a inibição/eliminação das bactérias metanogénicas (hidrogenotróficas) (Won & Lau, 2011). A seleção dos microrganismos produtores de bioH₂ foi feita através da aplicação de um tratamento térmico que consistiu no aquecimento do inóculo a uma temperatura de 90 °C durante 45 min. Estas condições tendem a promover a seleção de bactérias produtoras de bioH₂, dada a sua capacidade de formação de esporos, quando expostas a condições adversas (Hernández & Rodríguez, 2013; Guo *et al.*, 2010).

2.2.3. Alimentação do digestor

2.2.3.1. Preparação do substrato orgânico (alimento)

A casca de batata foi inicialmente desidratada, até apresentar uma variação de peso inferior a 5%. Para tal seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na determinação do teor de humidade (secção 2.1.1). Esta etapa teve por objetivo obter uma determinação da carga aplicada mais rigorosa, dada a variação do teor de humidade no resíduo obtido na indústria de aperitivos.

De seguida aplicou-se um pré-tratamento mecânico que consistiu na trituração do resíduo, em moinho de lâminas (*Phillips, Blender HR 2020*). O resíduo triturado foi crivado num crivo (*Retsch*) com malha de 2 mm. A trituração do resíduo é uma etapa crucial no processo fermentativo, visto que ao aumentar a área superficial do resíduo, incrementa-se a biodisponibilidade do substrato, favorecendo a eficiência da fermentação (Guo *et al.*, 2010). Este tratamento permite ainda minimizar a obstrução das tubagens do afluente e do efluente do bio-reator.

Na figura 2.3 apresenta-se o aspeto da casca de batata antes e depois da desidratação e após trituração e crivagem.

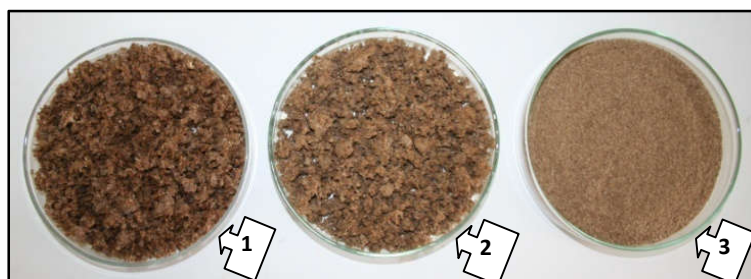


Figura 2.3 - (1) Casca de batata não tratada (tal como era obtida na indústria de aperitivos); (2) Casca de batata desidratada; (3) Casca de batata desidratada e triturada em moinho de lâminas.

O passo seguinte consistiu na introdução de 5,52 g de resíduo seco e triturado em frascos de vidro (*Schott*), tendo-se perfeito o volume dos mesmos a 0,7 L com água desionizada. Os

frascos foram de seguida autoclavados a 122 °C, sob pressão de 1,2 atm, durante 35 min (autoclave *DARLAB K-400*).

Com o objetivo de se averiguar a influência da alcalinização e do tempo de aquecimento do alimento no aumento da CQOs, e consequentemente, na biodisponibilidade do resíduo, procedeu-se do seguinte modo: após autoclavagem, o resíduo foi arrefecido, o meio alcalinizado com NaOH (1N) até atingir um pH=12. De seguida a solução previamente alcalinizada foi sujeita a aquecimento em banho de água (*PSelecta, PRECISD G*), a 95 °C, durante dois tempos diferentes: 30 min (**A.30**) e 60 min (**A.60**). O alimento que foi apenas autoclavado é identificado neste trabalho com o código **A.00**. Cada um dos ensaios foi realizado em triplicado.

Na Figura 2.4 apresenta-se uma imagem dos substratos de casca de batata submetidos a diferentes tratamentos.

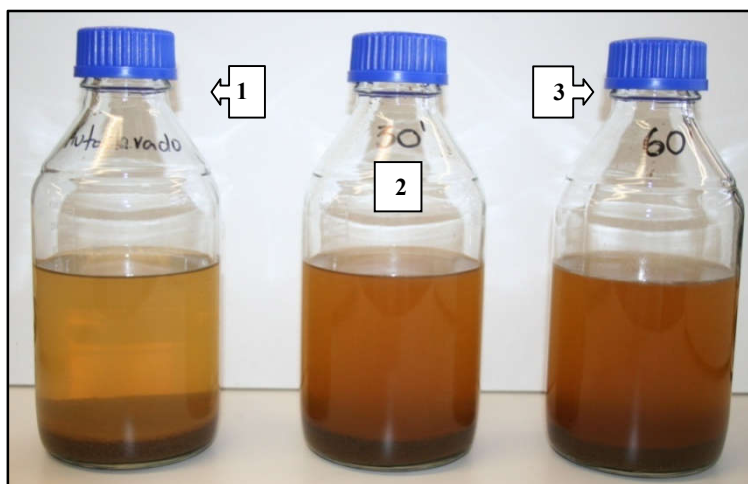


Figura 2.4 -Substratos de casca de batata pré-tratados por via térmica e termoquímica: (1) Substrato autoclavado (A.00); (2) Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água (95 °C) durante 30 min (A.30); Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH (1N) e aquecido em banho de água (95 °C) durante 60 min (A.60).

A quantificação da CQOs foi realizada com base na metodologia e equações constantes em 2.2.4.2.

A escolha do tratamento a aplicar ao substrato utilizado no presente trabalho recaiu sobre o tratamento A.30, visto ter apresentado resultado superiores (em termos de CQOs) aos alcançados pelo tratamento A.00, embora ligeiramente inferiores, mas próximos, aos obtidos no tratamento A.60, o que permite um menor gasto de energia elétrica utilizada no aquecimento do banho de água.

A alcalinização poderia ter sido realizada antes da autoclavagem, o que permitiria economizar energia elétrica despendida na utilização do banho de água. Contudo, dado o elevado risco de danificação da autoclave, em caso de fuga de conteúdo do frasco, pelo facto de não se ter utilizado um recipiente de elevada resistência mecânica, optou-se pelo procedimento anteriormente descrito.

2.2.3.2. Alimentação do bio-reator

O bio-reator foi alimentado a cada dois dias, sempre no período entre as 17 e as 19h, num total de três alimentações por semana.

O substrato orgânico (alimento) utilizado para a alimentação em todos os ensaios foi o A.30.

O volume do afluente foi de 0,7 L em todas as alimentações. A carga de CQOt aplicada ao bio-reator, em todos os ensaios, foi de $10 \text{ gO}_2 \cdot \text{L}_r^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. O cálculo da massa de resíduo correspondente a esta carga aplicada foi realizada com base nos resultados da CQOt do resíduo (secção 2.1.2).

A massa de resíduo correspondente à carga aplicada foi calculada a partir da equação 22:

$$CA_{CQOt} = \frac{CQOt_{afluente} \times V_{af}}{V_r \times TRH} \quad (\text{Eq. 22})$$

Onde,

CA_{CQOt} : Carga aplicada de CQOt ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

$CQOt_{afluente}$: Carência química de oxigénio do afluente ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

V_{af} : Volume do afluente (L)

V_r : Volume útil do reator (L)

TRH : Tempo de retenção hidráulico (d)

Antes da alimentação, procedeu-se ao acerto do pH do afluente, com HCl (1N), até se atingir um pH próximo do pretendido para cada um dos ensaios.

De seguida, aqueceu-se a amostra em banho de água até atingir uma temperatura próxima da do interior do digestor (37°C), de modo a reduzir o impacte térmico no bio-reator, resultante do fornecimento de substrato.

Os passos realizados em cada alimentação foram os seguintes: 1) Desligar o sistema de agitação e aguardar a deposição da biomassa no fundo do digestor, de modo a reduzir a sua saída juntamente com o efluente; 2) Fechar a linha de biogás; 3) Introduzir o afluente, por gravidade; 4) Abrir a linha de saída de efluente; 5) Recolher um volume de efluente igual ao volume de substrato (0,7 L); 6) Encerramento das linhas de entrada e saída dos afluente e efluente, respetivamente; 7) Abertura da linha de biogás.

Em todas as alimentações realizou-se a recolha de uma amostra de afluente e efluente para frascos de vidro, que foram preservados no frigorífico, à temperatura de 4 °C, até ao momento da sua análise.

2.2.4. Caracterização físico-química das amostras de afluente e efluente

Ao longo do trabalho experimental foram recolhidas amostras de afluente e efluente em todos os ensaios. Estas amostras foram analisadas quanto aos teores de sólidos (ST, SF e SV) e CQO (total e solúvel). O pH dos afluentes foi também medido à saída do digestor, com eletrodo de pH (*Thermo Scientific, Orion Star A215*).

2.2.4.1. Teores de sólidos

Os teores de sólidos (ST, SF e SV) foram determinados recorrendo ao procedimento descrito em 2.1.2. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.2.4.2. CQO

A CQO total e solúvel dos afluentes e efluentes foi determinada em duplicado, recorrendo à metodologia descrita em 2.1.3, salvo que para estas etapas se utilizou volumes de amostra e não massas, uma vez que se tratavam de amostras líquidas.

Para a determinação da CQOt utilizaram-se amostras integrais dos afluentes e efluentes.

Dada a natureza heterogénea dos afluentes e efluentes, nomeadamente o elevado teor de partículas em suspensão com uma grande velocidade de sedimentação, de modo a proceder-se a uma amostragem o mais representativa possível adoptou-se o protocolo seguinte: 1) Introduziu-se uma barra magnética dentro do frasco onde se encontravam reservadas as amostras; 2) Colocou-se o frasco sobre uma placa de agitação; 3) Recolheu-se o volume desejado, para um tubo de digestão, com o auxílio de uma pipeta de vidro.

Para a determinação da CQOs utilizou-se apenas a fração líquida dos afluentes e efluentes, (sobrenadante). Para a obtenção desta fração procedeu-se à centrifugação (centrifugadora *Sigma 4K15C*) das amostras durante 10 min, a 10959 g, à temperatura constante de 20 ± 1 °C.

Para o cálculo das concentrações de CQO recorreu-se às equações 12 (secção 2.1.3) e 23:

$$CQO = \left(\frac{V_{t,b} - V_{t,a}}{V_a} \times K_1 \times T \right) \times F_d \quad (\text{Eq.23})$$

Onde,

CQO: Carência química de oxigénio (mg. L⁻¹)

V_{t,b}: Volume de titulante gasto no branco (mL)

V_{t,a}: Volume de titulante gasto na amostra (mL)

V_a: Volume de amostra (mL)

T: Título (N)

K₁: Valor constante = 8000 mg. L⁻¹

F_d: Factor de diluição

2.2.5. Quantificação e caracterização do biogás

A quantificação do volume (mL) do biogás produzido foi realizada através da leitura direta da escala graduada da coluna de gás. O volume de biogás retido no *head space* do bio-reator e tubagens não foi contabilizado, uma vez que este volume permanecia constante ao longo dos ensaios.

A colheita do biogás, para análise, foi efetuada em sacos *Tedlar*.

O biogás foi analisado posteriormente, no Departamento de Química, através de cromatografia gasosa (CG–TCD), para os seguintes gases: H₂, O₂, N₂, CH₄, CO₂. As condições do método utilizado encontram-se descrita na tabela 2.3.

Tabela 2.1 - Condições do método utilizadas na análise cromatográfica das amostras de biogás

Colheita da amostra	Gás de arraste	Caudal (mL/min)	Quantidade injetada (μL)	Temperatura do injetor (°C)	Perfil de temperatura	Detetor
Recolha direta do saco de amostragem com seringa gas-tight de 250 μL.	He	1	250	200	Isotérmico: 35 °C durante 50 min	Detetor de condutividade térmica (TCD)

O volume total do biogás que foi considerado para o cálculo dos rendimentos consistiu no somatório do volume registado em cada um dos dias de amostragem.

O volume de bioH₂ foi calculado com base nas percentagens de H₂ obtidas nos cromatogramas e das retas de calibração construídas para cada um dos gases bem como do volume de biogás produzido (equação 24):

$$V_{bioH_2} = \left(\frac{\% H_2 \times V_{biogás}}{100} \right) \quad (\text{Eq. 24})$$

Onde,

V_{bioH_2} : Volume de bioH₂ (mL)

% H₂: Percentagem de H₂ no biogás, obtida por CG – TCD (% v/v)

$V_{biogás}$: Volume de biogás produzido (mL)

Procedeu-se ao cálculo do caudal médio de biogás e de bioH₂ através das equações 25 e 26:

$$\bar{Q}_{biogás} = \left(\frac{\left[\frac{V_{m1}}{n_{m1}} + \frac{V_{m2}}{n_{m2}} + \frac{V_{m3}}{n_{m3}} \right]}{3} \right) \times 24h \quad (\text{Eq. 25})$$

Onde,

$\bar{Q}_{biogás}$: Caudal médio de biogás (mL. d⁻¹)

V_{m1}, V_{m2}, V_{m3} : Volume de biogás nos dias 1, 2 e 3 de colheita, respetivamente (mL)

n_{m1}, n_{m2}, n_{m3} : Número de horas de produção correspondentes a cada ponto de amostragem (h)

$$Q_{bioH_2} = \frac{V_{bioH_2}}{(t_f - t_i)} \quad (\text{Eq. 26})$$

Onde,

Q_{bioH_2} : Caudal de bioH₂ (mL. d⁻¹)

V_{bioH_2} : Volume de bioH₂ (mL)

t_f : Ultimo dia de acumulação de biogás (d)

t_i : Primeiro dia de acumulação de biogás (d)

2.2.6. Carga aplicada, eficiência de remoção e rendimentos de produção de biogás e bioH₂

Com a finalidade de se analisar a o desempenho do processo fermentativo, procedeu-se à análise da eficiência de remoção de SV e CQOs, bem como dos rendimentos de produção de biogás e bioH₂.

As eficiências de remoção de CQOs e SV foram calculadas através das equações de 27 e 28:

$$ER_{CQOs} = \frac{\overline{CQOs}_{af} - \overline{CQOs}_{ef}}{\overline{CQOs}_{af}} \quad (\text{Eq. 27})$$

Onde,

ER_{CQOs} : Eficiência de remoção de CQOs (adi.)

\overline{CQOs}_{af} : Média da CQOs nos afluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

\overline{CQOs}_{ef} : Média da CQOs nos efluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$$ER_{SV} = \frac{\overline{SV}_{af} - \overline{SV}_{ef}}{\overline{SV}_{af}} \quad (\text{Eq. 28})$$

Onde,

ER_{SV} : Eficiência de remoção de SV (adi.)

\overline{SV}_{af} : Média de SV dos afluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

\overline{SV}_{ef} : Média de SV dos efluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Os rendimentos de produção de biogás e bioH_2 foram calculados com base nas equações 29 a 32:

$$\eta_{gás(CQOs\ removida)} = \frac{\overline{Q}_{gás}}{CA_{CQOs} \times ER_{CQOs} \times V_r} \quad (\text{Eq. 29})$$

Onde,

$\eta_{gás(CQOs\ removida)}$: Rendimento de produção de gás (biogás ou bioH_2) relativa à remoção de CQOs ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{CQOs}$)

$\overline{Q}_{gás}$: Caudal médio de gás (biogás ou bioH_2) ($\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$)

CA_{CQOs} : Carga de CQOs aplicada ao reator ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

ER_{CQOs} : Eficiência de remoção de CQOs (adi.)

V_r : Volume do reator (L)

A carga de CQOs aplicada ao bio-reator foi calculada com recurso à equação 30:

$$CA_{CQOs} = \frac{\overline{CQOs}_{af} \times V_{af}}{V_r \times TRH} \quad (\text{Eq. 30})$$

Onde,

CA_{CQOs} : Carga aplicada de CQOs ($\text{g O}_2 \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

\overline{CQOs}_{af} : Média da CQOs dos afluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

V_{af} : Volume do afluente (L)

V_r : Volume do reator (L)

TRH : Tempo de retenção hidráulico (d)

Os rendimentos de produção de gás (biogás ou bioH₂) foram calculados com recurso à equação 31:

$$\eta_{gás (SV \text{ removidos})} = \frac{\overline{Q}_{gás}}{CA_{SV} \times ER_{SV} \times V_r} \quad (\text{Eq.31})$$

Onde,

$\eta_{gás(SV \text{ removidos})}$: Rendimento de produção de gás (biogás ou bioH₂) relativa à remoção de SV ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}$)

$\overline{Q}_{gás}$: Caudal médio de gás (biogás ou bioH₂) ($\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$)

CA_{SV} : Carga de SV aplicada ao bio – reator ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{reator} \cdot \text{d}^{-1}$)

ER_{SV} : Eficiência de remoção de SV (adi.)

V_r : Volume do reator (L)

A carga de SV aplicada ao bio-reator foi calculada com recurso à equação 32:

$$CA_{SV} = \frac{\overline{SV}_{af} \times V_{af}}{V_r \times TRH} \quad (\text{Eq. 32})$$

Onde,

CA_{SV} : Carga aplicada de SV ($\text{g} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

\overline{SV}_{af} : Média dos SV dos afluentes ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

V_{af} : Volume do afluente (L)

V_r : Volume do reator (L)

TRH : Tempo de retenção hidráulico (d)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CASCA DE BATATA

Na figura 3.1 apresentam-se as percentagens de massa médias de humidade, ST, SF e SV da casca na batata.

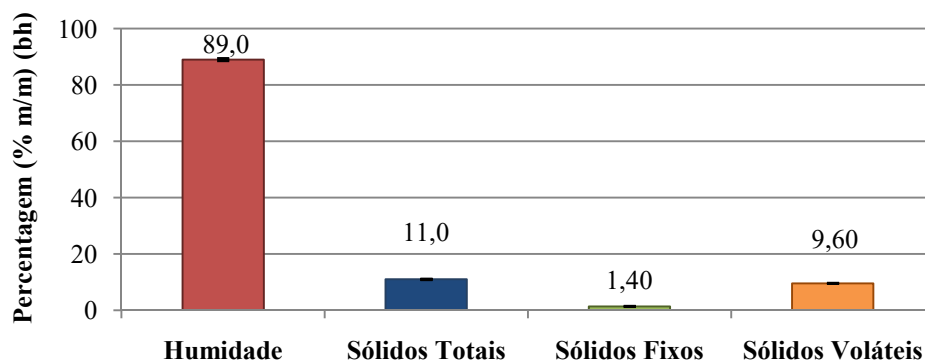


Figura 3.1 - Teores de humidade e sólidos na casca de batata (as barras dos desvios-padrão são diminutas dado o seu reduzido valor; bh: base húmida) (número de amostras, $n=3$).

Para a realização da análise elementar, procedeu-se à secagem prévia do substrato, à temperatura de 60 °C, durante 12h (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Caracterização elementar da casca de batata

Parâmetro	Teor Médio
C (% m/m bs)	46,4
H (% m/m bs)	7,6
N (% m/m bs)	1,5
S (% m/m bs)	<0,1
O (% m/m bs)	43,1
C/N	30,9:1

bs: base seca

Quanto à caracterização físico-química realizada, verifica-se que a fração predominante da casca de batata corresponde à humidade(89,0% m/m). Os restantes 11,0% m/m dizem respeito aos ST, dos quais 1,40% m/m são SF e 9,60% m/m são SV.

Foram encontrados vários estudos nos quais se utilizou casca de batata e cujos resultados são comparáveis com os obtidos no presente trabalho. Os dados de parte da literatura analisada encontram-se na tabela 3.2 e são confrontados de seguida com os obtidos na presente dissertação.

Tabela 3.2 - Comparação dos resultados da caracterização físico-química do material de partida com dados da literatura

Substrato	Humidade (% m/m)	ST (% m/m)	SF (% m/m)	SV (% m/m)	Referência
Casca de batata	89,0	11,0	1,40	9,60	Presente estudo
Casca de batata	90,8	9,20	1,70	7,50	Liang & McDonald, 2015
Casca de batata	88,8	11,2	0,60	10,6	Azeitona, 2012
Polpa e casca de batata	83,6	16,4	1,40	15,0	Kryvoruchko <i>et al.</i> , 2009
Casca de batata	77,4	22,6	1,20	21,4	Kaparaju & Rintala, 2005

O teor de humidade foi muito semelhante em todos os estudos (Liang & McDonald, 2015; Azeitona, 2012; Kryvoruchko *et al.*, 2009; Kaparaju & Rintala, 2005), apresentando entre eles uma variação de apenas 6%. A nível dos SF também se verifica uma grande concordância de resultados, sendo que a maior diferença se encontra no trabalho de Azeitona (2012) que apresenta uma percentagem de 0,60% m/m, valor bastante inferior ao obtido nos restantes trabalhos. Quanto aos teores de SV, detetou-se uma acentuada variabilidade entre todos os estudos, registando-se uma variação de 44%. Estas diferenças podem ser devidas à variedade de batata utilizada ou à maturidade da mesma, dado que as suas características podem mudar com estes fatores (Nayak *et al.*, 2014).

Relativamente à CQOt, obteve-se $1,27 \times 10^3 \text{ gO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (bs). Estes resultados vão de encontro aos resultados das dissertações de Santos (2013) e Carapinha (2012) de $1,55 \times 10^3 \text{ gO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (bs) e $1,47 \times 10^3 \text{ gO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (bs), respetivamente.

Na medida em que a fermentação no escuro tem por base a atividade microbiológica é necessário que os substratos utilizados sejam nutricionalmente equilibrados, de modo a obter-se o máximo rendimento possível na produção de bioH₂. Os nutrientes essenciais (macro e micronutrientes) têm que estar presente nas concentrações ideais. Três dos macronutrientes essenciais são o carbono, o azoto e o fósforo.

O carbono orgânico é essencial à síntese, metabolismo e crescimento celular, sendo utilizado como fonte de energia e na formação de novas células (Wang *et al.*, 2016; Gerardi, 2003).

O teor médio de carbono obtido no presente trabalho foi de 47,5% m/m (bs). Este valor foi determinado a partir dos valores da CQOt, recorrendo ao fator de conversão O₂ em C de 0,375. Este resultado está próximo do obtido na análise elementar (46,4% m/m bs). Liang & McDonald (2015) e Kryvoruchko *et al.* (2009) relatam valores semelhantes (43,8% m/m e 41,6% m/m,

respetivamente). Os resultados obtidos por Azeitona (2012) e Carapinha (2012) foram superiores (57,6% m/m e 52,9% m/m, respetivamente).

Os substratos que contêm azoto (p.e., proteínas) têm um impacto considerável na fermentação, dado que este elemento é essencial à síntese, manutenção e metabolismo celular, estando na constituição de alguns das suas moléculas mais importantes (p.e., proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) (Wang *et al.*, 2016; Rughoonundun *et al.*, 2012), bem como de enzimas hidrolíticas, como a celulase (Smith & Holtzapple, 2011).

O resíduo apresentou um teor médio de 7,32 gN.kg⁻¹ (bs) (0,73% m/m). Valores semelhantes foram obtidos por Santos (2013) com resultados médios na ordem dos 0,64% m/m (bs). Um resultado inferior foi relatado por Carapinha (2012) com 0,51% m/m (bs). Nos restantes estudos analisados (Choi *et al.*, 2016; Azeitona, 2012) o teor de azoto da casca de batata foi substancialmente superior, na ordem dos 1,50% m/m (bs). Tal diferença pode-se dever à metodologia utilizada.

A razão C/N é um parâmetro que quantifica a proporção relativa de carbono relativamente ao azoto (Smith & Holtzapple, 2011). Uma elevada razão C/N resulta numa quantidade insuficiente de N para que ocorra a manutenção da biomassa microbiana enquanto que uma razão C/N excessivamente reduzida pode levar, pela elevada concentração de N, à produção de azoto amoniacal em concentração tóxica para os microrganismos (Lin & Lay, 2004). Uma razão C/N apropriada pode aumentar a produção de bioH₂, através da mudança das vias metabólicas microbianas (Lin & Lay, 2004). No entanto uma razão demasiado elevada (superior a 20) pode resultar no aumento da produção de ácido láctico e propiónico, produtos não relacionados com a produção de bioH₂ (Kim *et al.*, 2006a).

Wang *et al.* (2016) estudaram o efeito de diferentes razões C/N (6,0–15,2) na produção de bioH₂, utilizando como substrato águas residuais contendo amido de milho (substrato de fácil degradação microbiológica (Liang *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2008). O melhor resultado foi obtido com a razão de 9,1, tendo sido a produção muito reduzida nas razões 6,0, 10,3 e 15,2, demonstrando a importância deste parâmetro para o sucesso da produção biológica de hidrogénio.

No presente estudo a razão C/N utilizada foi de 58,6 gC.g⁻¹ TKN. Este valor é difícil de comparar com a restante literatura consultada sobre a influência deste parâmetro na produção de bioH₂ (Wang *et al.*, 2016; Anzola-Rojas, *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2006a; Lin & Lay, 2004) (Tabela 3.3) dada a utilização de unidades e substratos diferentes. Para além disso, a quantidade de azoto é importante, mas também a sua proveniência (Ward *et al.*, 2008). De acordo com

Wang *et al.* (2016), caso a fonte de azoto não seja a mais apropriada, os microrganismos tenderão mais para a multiplicação celular do que para a produção de bioH₂.

A determinação da razão C/N, quando realizada a partir do valor de carbono orgânico total (COT) e azoto total (NT), acaba por ser muitas das vezes sobrestimada. Nem sempre a razão C/N determinada corresponde à razão C/N biodegradável. Enquanto o azoto se encontra na maioria das vezes na forma de proteínas, que são relativamente biodegradáveis, o carbono apresenta-se por vezes sob formas não biodegradáveis (Puyuelo *et al.*, 2011).

É de ressaltar ainda que existe uma correlação positiva entre o azoto e o fósforo presentes no meio. Argun *et al.* (2008), estudaram a relação entre estes dois elementos na produção de bioH₂, através da fermentação no escuro de uma solução contendo pó de trigo, demonstrando que para uma reduzida concentração de azoto é recomendada uma reduzida concentração de fósforo e vice-versa.

Tabela 3.3 - Comparação de razões C/N com dados obtidos da literatura

Substrato	Inóculo	Intervalo estudado	Razão C/N	Unidade	Referência
Casca de batata	Cultura mista recolhida num reator anaeróbio	–	58,6 (37°C)	gC.g ⁻¹ TKN	Presente estudo
Substrato sintético contendo glucose	Cultura mista obtida por tratamento térmico de lamas de reator anaeróbio (maioritariamente bactérias pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i>)	100–250	200	Não especificada	Carosia <i>et al.</i> , 2017
Águas residuais contendo amido de milho	<i>Bacillus</i> sp. A1 e <i>Brevumdimonas</i> sp. B1	6–15,2	9,1 (35°C)	gCOT.g ⁻¹ NT	Wang <i>et al.</i> , 2016
Água residual sintética (sacarose e ureia)	Cultura mista (98,7% das bactérias pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i>)	40–190	137 (25°C)	gC.g ⁻¹ N	Anzola-Rojas, <i>et al.</i> , 2015
Resíduos alimentares	Cultura mista recolhida num reator anaeróbio	20–30	<20 (35°C)	g hidratos de carbono CQO.g ⁻¹ TKN	Kim D. H. <i>et al.</i> , 2006a
Sacarose	Lamas de ETAR tratadas termicamente (organismo dominante <i>Clostridium pasteurianum</i>)	40–130	47 (35°C)	gCQO.g ⁻¹ N	Lin & Lay, 2004

Para além de ser um macronutriente indispensável à nutrição dos microrganismos, o fósforo tem ainda a capacidade de promover efeito tampão do meio de cultura, sendo de grande importância à manutenção do pH das reações bioquímicas (Ghimire *et al.*, 2015a).

A casca de batata utilizada no presente trabalho apresentou uma concentração de fósforo de $2,15 \times 10^3 \mu\text{g.g}^{-1}$ (0,21% m/m). Este valor é muito superior ao obtido por Santos (2013), 0,08% m/m, no entanto encontra-se consideravelmente abaixo dos valores alcançados por Azeitona (2012) e Carapinha (2012), com 0,30% e 0,46% m/m, respetivamente. Esta discrepância pode ser devida à utilização de diferentes variedades de batata, visto que pode haver uma grande variação na concentração de fósforo em função deste fator (Absar *et al.*, 2009).

Estes valores levaram a uma concentração de fósforo no afluente de $0,017 \text{ gP.L}^{-1}$, encontrando-se este resultado em linha com o obtido por Zhu *et al.* (2008) ($0,012 \text{ gP.L}^{-1}$). Em contrapartida, esta concentração encontra-se muito abaixo da aplicada por Parawira *et al.* (2004) que utilizou um afluente contendo $1,3 \text{ gP.L}^{-1}$.

Tal como a razão C/N, a razão C/P também se revela muito importante no processo de fermentação no escuro, havendo uma inter-relação entre estes dois parâmetros.

Num estudo levado a cabo por O-Thong *et al.* (2008), foi demonstrado que ajustando as razões C/N e C/P, bem como a concentração de ferro, utilizando águas residuais contendo óleo de palma, foi possível incrementar a produção de bioH_2 em 60%. A presença de $257 \text{ mgFe}^{2+}.\text{L}^{-1}$, simultaneamente com as razões C/N de 74 e C/P de 559, permitiu alcançar os melhores resultados em termos de produção de bioH_2 ($6,33 \pm 0,142 \text{ LH}_2.\text{L}^{-1}$ substrato) e remoção de CQO ($55 \pm 1,5\%$).

A razão C/P utilizada no presente trabalho foi de 1991. Este resultado foi comparado com resultados obtidos em estudos onde foi estudada a influência da C/P na produção biológica de hidrogénio (Tabela 3.4). Como se pode verificar, a razão obtida foi muito superior aos valores ótimos constantes na literatura para a produção de bioH_2 no entanto, são também eles diferentes entre si. Carosia *et al.* (2017) utilizaram como substrato um afluente sintético contendo glucose e obtiveram uma razão ótima C/P de 700/1. Por último Argun *et al.* (2008), utilizando uma solução contendo pó de trigo, enriquecida com N e P, encontraram uma razão ótima de 1000/1, não se podendo, a partir daqui, concluir que o valor ótimo não poderia ser mais elevado do que o que foi indicado por estes autores, visto que a razão ótima por eles indicada se encontra no limite superior do intervalo estudado.

Tabela 3.4 - Comparação da razão C/P com dados da literatura

Substrato	Inóculo	Intervalo estudado	Razão C/P	Referências
Casca de batata	Cultura mista recolhida num reator anaeróbio	—	1991	Presente estudo
Substrato sintético contendo glucose	Cultura mista obtida por tratamento térmico de lamas de reator anaeróbio (maioritariamente bactérias pertencentes ao filo Firmicutes)	300–1100	700	Carosia <i>et al.</i> , 2017
Efluente contendo óleo de palma	Cultura mista recolhidas de um reator anaeróbio (maioritariamente <i>Thermoanaerobacterium sp.</i>)	450–650	559	O-Thong <i>et al.</i> , 2008
Solução contendo pó de trigo, enriquecida com N e P	Lamas de tratamento anaeróbio de águas residuais (fase acidogénica) tratadas termicamente	50–1000	1000	Argun <i>et al.</i> , 2008

3.2. PRÉ-TRATAMENTOS (SUBSTRATO)

A escolha dos pré-tratamentos testados teve por base os resultados obtidos na dissertação de Lucas (2014), cujo âmbito do estudo foi a avaliação do efeito de vários pré-tratamentos químicos, aplicados à casca de batata, utilizada na produção de biogás. O melhor resultado foi alcançado através da alcalinização da solução, contendo água e casca de batata triturada, com NaOH (1 N) até pH=12, posteriormente aquecida em banho de água a 50 °C. Com este tratamento foi conseguido um aumento de 30,1% na CQOs, bem como um aumento do rendimento de produção de CH₄ superior a 50%, em relação ao ensaio de controlo (casca de batata sem pré-tratamento). Concluiu-se assim que este pré-tratamento foi adequado ao aumento da biodisponibilidade dos constituintes da casca de batata.

Os resultados dos três pré-tratamentos térmicos e termoquímicos, testados no presente trabalho, são apresentados na figura 3.2.

No tratamento A.00 obteve-se o valor de CQOs mais baixo (11,8 g.L⁻¹). Os resultados obtidos em A.30 e A.60, 18,3 e 19,6 g.L⁻¹ respetivamente, foram substancialmente mais elevados do que o ensaio de controlo (A.00), sendo estes no entanto muito próximos entre si. Assim, pela

proximidade do resultado dos dois últimos tratamentos e pelo menor gasto energético associado ao menor tempo de exposição à temperatura em banho de água, a escolha do tratamento para os ensaios de fermentação anaeróbia recaiu sobre o tratamento A.30.

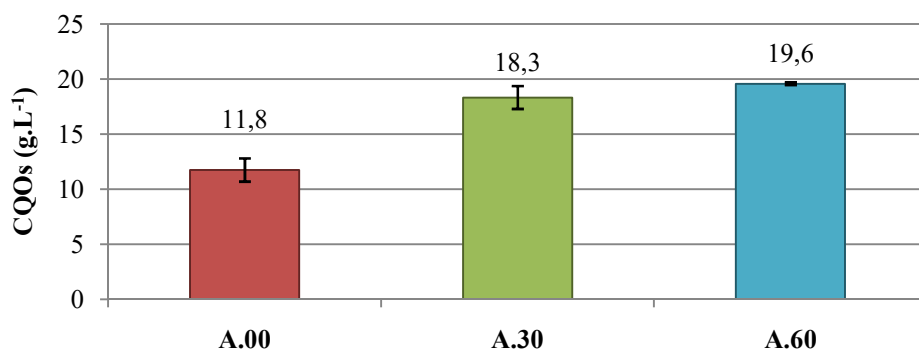


Figura 3.2 - Valores médios e desvios-padrão da CQOs correspondentes aos pré-tratamentos testados (A.00: Substrato autoclavado; A.30: Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água durante 30 min.; A.60: Substrato autoclavado, alcalinizado até pH 12 (NaOH 1N) e aquecido em banho de água durante 60 min.).

3.3. ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

3.3.1. ENSAIO E.7 (pH7)

3.3.1.1. Parâmetros operacionais

Ao longo dos ensaios foi realizada a monitorização e registo dos valores relativos aos parâmetros operacionais dentro do reator (temperatura, pH e potencial redox). Para a temperatura e potencial redox o registo foi efetuado com base nos valores registados nos módulos de controlo digital, antes (A.A) e depois (P.A) de cada alimentação, de modo a averiguar o nível de perturbação causado no digestor pela entrada do afluente. Os valores de pH são relativos ao pH dos efluentes.

Os dados relativos ao ensaio realizado a pH 7 (E.7) encontram-se na figura 3.3.

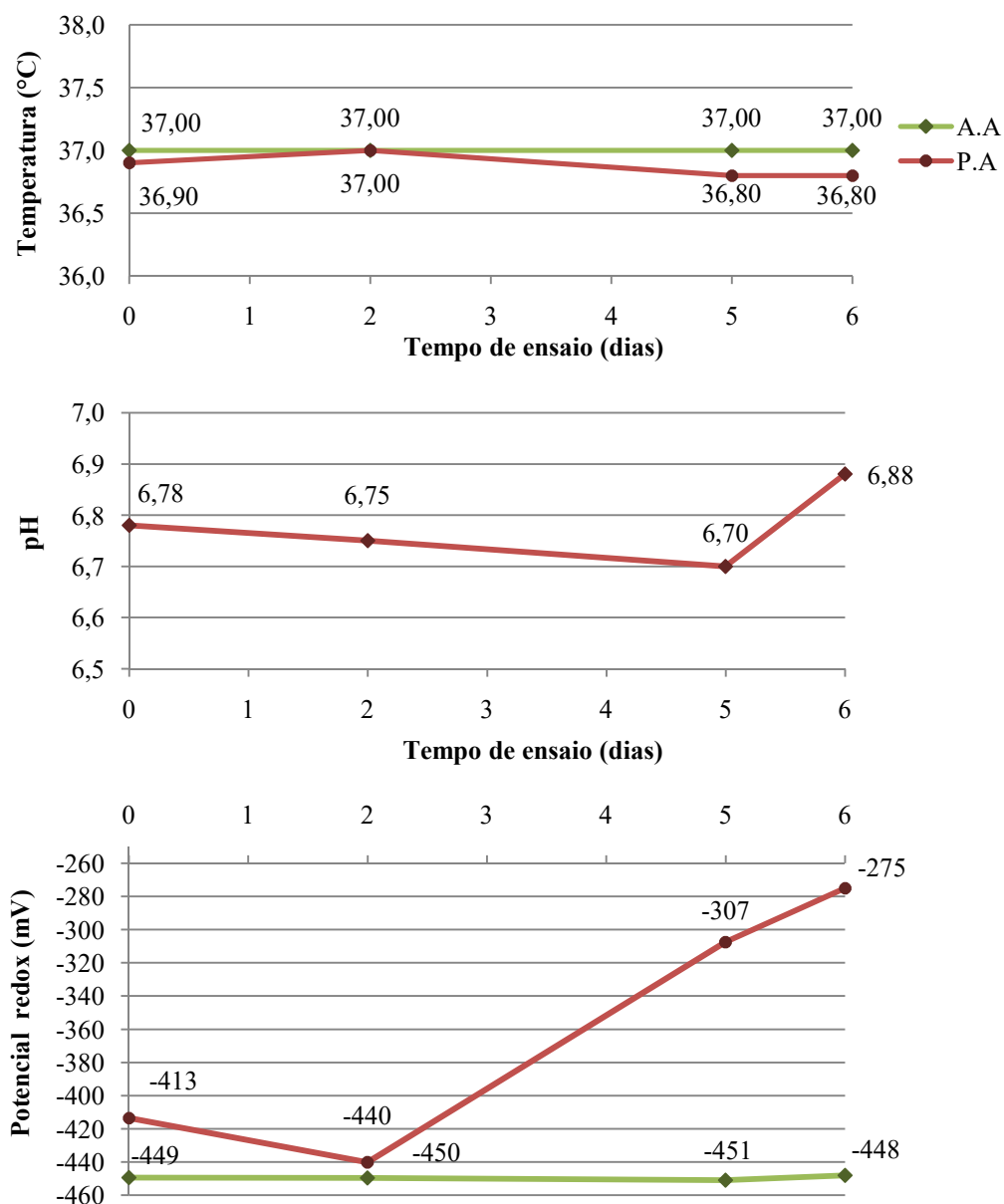


Figura 3.3 - Variação da temperatura, pH e potencial redox do interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.7. (A.A: Valores anteriores à alimentação; P.A: Valores posteriores à alimentação).

A temperatura do interior do digestor apresentou um valor médio e um desvio padrão de $36,4 \pm 0,09$ °C. Verificou-se um ligeiro decréscimo, nunca inferior aos 36,8 °C, após a introdução do alimento. A reduzida variação da temperatura foi possível através do aquecimento prévio do substrato, até uma temperatura próxima dos 37 °C, antes da sua introdução no bio-reator. Após a alimentação a recuperação da temperatura foi muito rápida, mantendo-se constante ($37 \pm 0,1$ °C) durante o restante tempo de ensaio.

O bio-reator apresentou uma variação muito ligeira nos valores de pH ($6,78 \pm 0,08$). Ocorreu uma descida de pH, de 6,78 para 6,70, entre o início do ensaio ($t=0$ d) e o quinto dia de ensaio.

Este decréscimo dos valores de pH pode ter ocorrido devido à acumulação de CO₂ e AGV's produzidos no processo fermentativo. Do quinto para o sexto dia verificou-se um ligeiro aumento do pH, de 6,70 para 6,88.

Embora a utilização de um único substrato possa resultar num fraco poder tampão (Kaparaju & Rintala, 2005), a manutenção dos valores de pH foi satisfatoriamente alcançada pela adição automática de HCl (1N) e NaOH (1N), conseguindo-se manter os valores de pH próximos do valor pretendido para este ensaio (pH=7,0).

O potencial de oxidação-redução é especialmente importante para a produção fermentativa de hidrogénio, visto que este parâmetro causa alterações a nível do crescimento bacteriano através da interferência com a fisiologia bacteriana em processos tão importantes como a manutenção do pH do interior das células e o potencial transmembranar (Khanna *et al.*, 2011).

Ao longo do ensaio verificou-se pouca alteração dos valores de potencial redox antes da introdução do afluente (A.A), rondando sempre valores próximos dos -450 mV. Em contrapartida observou-se que o momento da alimentação (P.A) constituiu-se como fator de perturbação do potencial redox, levando ao aumento do valor deste parâmetro. Observou-se uma perturbação relativamente reduzida na segunda alimentação (t=2d), traduzindo-se num valor de -440 mV e uma perturbação mais significativa na quarta alimentação (t=6d), com a obtenção de um potencial redox de -275 mV. Apesar destes aumentos do potencial redox, os valores mantiveram-se dentro do intervalo considerados adequados por Lin & Lay (2004) para a produção de bioH₂ (-158 e -453 mV) num estudo sobre o efeito da C/N na produção de bioH₂.

3.3.1.2. Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes

A figura 3.4 apresenta os teores médios e respetivos desvios-padrão de sólidos presentes nos afluentes e efluentes do reator anaeróbio, durante o E.7.

Obteve-se uma eficiência de remoção de SV de 66,9 % (de 7,91 para 2,62 gSV.L⁻¹) e de ST de 43,5% (de 8,73 para 4,93 gST.L⁻¹).

Relativamente aos sólidos fixos, verificou-se um aumento da proporção de cinzas, nos ST, da entrada para a saída do bio-reator.

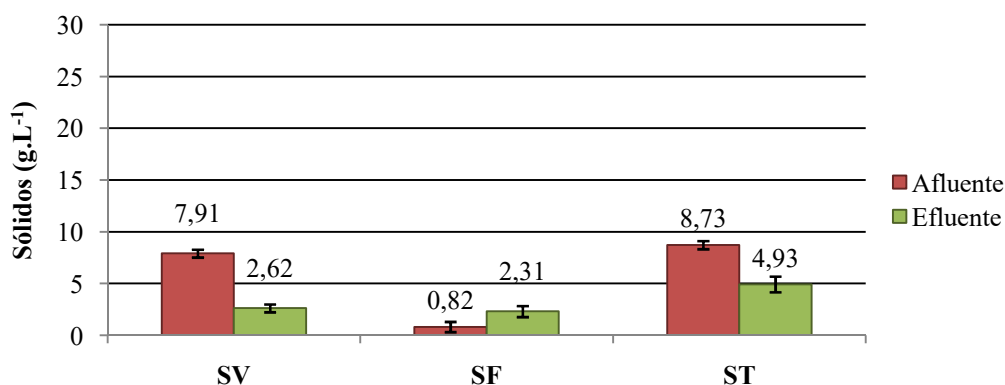


Figura 3.4 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.7.

Relativamente à CQOt (figura 3.5), foi alcançada uma eficiência de remoção de 63,9% (de 72,8 para 26,3 gO₂.L⁻¹). Este resultado é próximo do melhor resultado alcançado por Mohanakrishna *et al.* (2011), num estudo onde investigaram a produção de bioH₂ a partir da fermentação de um extrato obtido da trituração de resíduos vegetais (tomate, batata, cenoura, beringela, entre outros), à temperatura ambiente e pH=6,0. Neste estudo foi alcançada uma remoção máxima de CQOt de 68,1%, com a aplicação de 4,5 kgCQO.m⁻³ e mínima de 27,3%, com a aplicação de 35,3 kgCQO.m⁻³. Os autores supracitados demonstraram uma relação inversa entre a carga de CQOt aplicada ao bio-reator e a eficiência de remoção, tendo obtido eficiências mais baixas para os valores mais elevados de CQOt aplicados. No presente estudo a carga aplicada (calculada a partir da média de CQOt dos afluentes deste ensaio) foi de 34,7 kgCQO.m⁻³, valor próximo do que resultou numa menor eficiência de remoção no estudo destes autores, demonstrando que a carga aplicada no presente estudo foi adequada e poderia eventualmente ser mais reduzida.

Quanto à eficiência de remoção de CQOs obteve-se um valor de 15,0% (de 10,7 para 9,11 gO₂.L⁻¹).

É de ressaltar ainda que os valores de CQOs obtidos a partir da análise dos afluentes deste ensaio foram inferiores aos obtidos no tratamento utilizado (A.30) (18,3 gO₂.L⁻¹) estando mais próximo da concentração de 11,8 gO₂.L⁻¹ obtida com o pré-tratamento A.00. Esta incongruência pode ter sido devida à variabilidade da amostra.

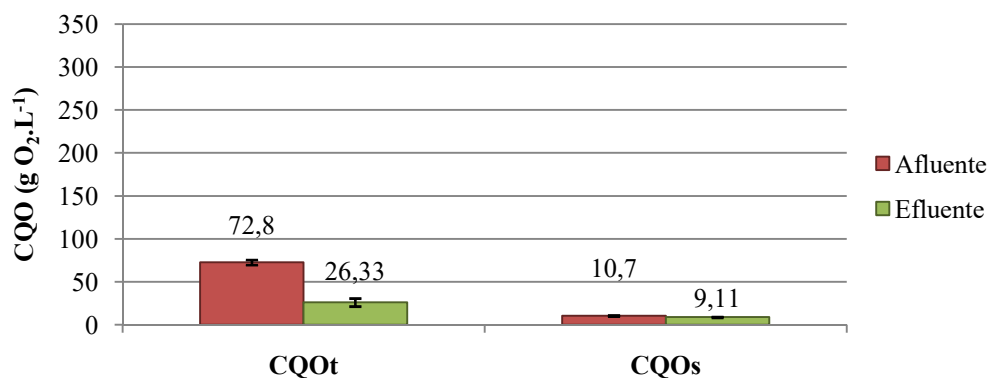


Figura 3.5 - Teores médios e desvios-padrão da CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes do digestor anaeróbio, relativos ao E.7 (as barras de erro são diminutas dado o seu baixo valor).

3.3.1.3. Quantificação e caracterização do biogás

A figura 3.6 resume os valores do caudal médio de biogás, caudal de bioH₂ e rendimento de produção de biogás, relativamente à CQOs removida e aos SV removidos.

O caudal médio de biogás obtido foi de 144 mL.d⁻¹ (68,6 mL.L⁻¹.d⁻¹), resultando num volume total de produção de 988 mL durante todo o ensaio. Este caudal é consideravelmente reduzido quando comparado com os resultados obtidos por Stavropoulos *et al.* (2016). Estes autores investigaram o efeito de vários valores de pH (4,0–5,7) na produção de bioH₂ a partir de um substrato rico em hidratos de carbono facilmente biodegradáveis (mistura de leite, queijo e iogurtes em fim de vida) tendo alcançado os melhores resultados ($2,7 \times 10^3$ mL.L⁻¹.d⁻¹) com o pH 5,0. O reduzido caudal obtido no presente estudo pode dever-se a uma composição nutricional pobre da casca de batata, como baixos teores de açúcares.

Outra possível explicação prende-se com o TRH aplicado no presente estudo, que pode não ter sido o mais adequado. Paudel *et al.* (2017) averiguaram a influência do TRH e carga aplicada na produção biológica de hidrogénio a partir da co-digestão de águas castanhas e resíduos orgânicos domésticos. Os autores obtiveram um caudal máximo de $1,4 \times 10^3$ mL.d⁻¹ com o TRH de 8h. O bio-reator operou a 37 °C e com pH controlado entre 5,0 e 5,5.

Neste ensaio não foi detetada a presença de hidrogénio. A ausência deste gás pode dever-se a vários fatores, de entre os quais o valor de pH utilizado. Segundo Elreedy *et al.* (2017), o intervalo de pH inicial favorável às etapas de hidrólise e acidogénese, e consequentemente à produção de bioH₂, encontra-se entre 5,0 e 6,5, dependendo do tipo de substrato, podendo o valor de pH do presente ensaio não ser o mais adequado para as bactérias acidogénicas e favorecer o desenvolvimento das bactérias metanogénicas.

Outra possível explicação prende-se com a ineficiência do pré-tratamento térmico aplicado ao inóculo, que não foi efetivo na eliminação das bactérias metanogénicas, como se veio a verificar pela presença de uma elevada percentagem de metano no biogás, e a não deteção de bioH_2 (figura 3.7). A natureza granular do inóculo (as bactérias encontram-se protegidas de condições adversas do meio) pode ter neutralizado a ação do calor, podendo ser aconselhável a realização de uma etapa de desagregação dos grânulos antes do pré-tratamento. Cisnero-Pérez *et al.* (2017) investigaram o efeito de dois pré-tratamentos (*washout celular*: TRH=8h e choque térmico: fervura durante 45 min) utilizando lama de ETAR granular (desagregada, em crivo com malha = 500 μm) como inóculo, na produção de bioH_2 a partir da fermentação no escuro de glucose. Os autores não detetaram a presença de CH_4 no biogás produzido, o que pode ter-se devido à sobre-exposição das bactérias ao calor, facilitada pela aplicação da etapa de desagregação. Os reduzidos valores de TRH (10, 6, 4 e 2h) e pH utilizados (5,5) poderão também ter tido um efeito favorável na eliminação das bactérias metanogénicas.

O TRH de 6 dias, bem como o pH 7 utilizados no presente trabalho não foram suficientemente reduzidos para suplantam a ineficiência do pré-tratamento.

O rendimento de produção de biogás por CQOs e SV removidos foi de 298 mL.g^{-1} CQOs e 74,7 mL.g^{-1} SV, respetivamente.

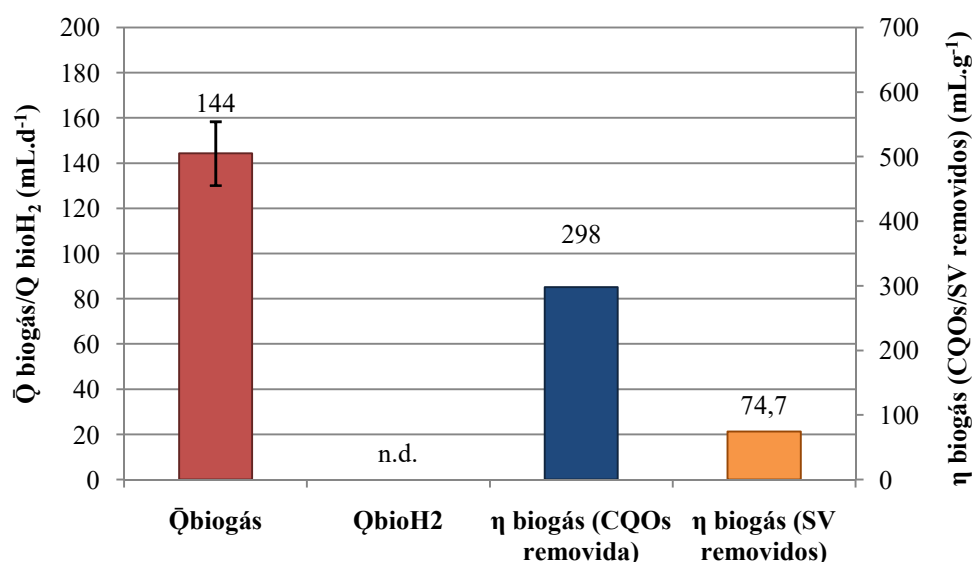


Figura 3.6 -Caudal médio de biogás, caudal de bioH_2 e rendimento de produção de biogás relativo à CQOs removida e aos SV removidos (n.d. – Não detetado) (as barras dos desvios-padrão, relativas aos rendimentos, são diminutas dado o seu reduzido valor) (número de amostras, $n=3$).

A figura 3.7 apresenta a variação da composição do biogás (CH_4 , CO_2 , O_2 e H_2) ao longo do ensaio E.7.

A presença de O₂ não foi detetada o que significa que foram alcançadas condições de anaerobiose.

Como foi anteriormente referido não se detetou a presença de bioH₂, sendo o biogás composto por CH₄ e CO₂.

Nas primeiras 48h ocorreu a produção intensiva de CH₄, tendo sido o seu teor máximo registado de 97,8% v/v ao segundo dia de ensaio. Esta subida é coincidente com o decréscimo do potencial redox após a alimentação (de -413 mV para -440 mV), para o mesmo período. Entre o segundo e o quinto dias e entre o quinto e o sexto dias verificou-se uma ligeira diminuição do teor de CH₄ no biogás (de 97,8% para 96,6% v/v e 96,6% para 93,7% v/v, respetivamente). Estas duas sucessivas descidas na concentração de CH₄ coincidem novamente com alterações a nível do potencial redox para os mesmos intervalos de tempo, onde desta vez ocorre a subida do potencial de oxidação redução (de -440 mV para -307 mV e de -307 mV para -275 mV, respetivamente). Deste modo, pode-se reforçar a importância deste parâmetro operacional como fator de evolução do processo de digestão anaeróbia.

A presença de metano em tão elevada concentração, pode ter-se devido ao facto deste ensaio ter decorrido a pH $6,78 \pm 0,08$, valor que se encontra dentro do intervalo considerado ótimo para a atividade das bactérias metanogénicas (Elreedy *et al.*, 2017; Ward *et al.*, 2012), que permaneceram no inóculo mesmo após a aplicação do pré-tratamento.

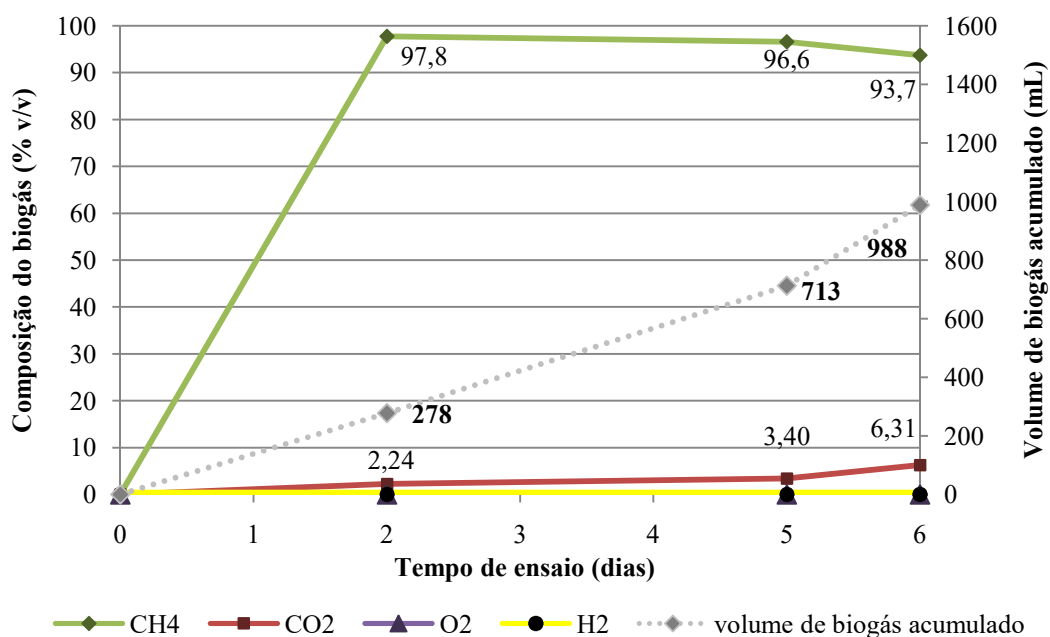


Figura 3.7 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás, ao longo do ensaio E.7.

3.3.2. ENSAIO E.6 (pH 6)

3.3.2.1. Parâmetros

Os dados relativos aos parâmetros operacionais do bio-reator (temperatura, pH e potencial redox), antes (A.A) e após (P.A) cada alimentação, relativos ao ensaio E.6, são apresentados na figura 3.8.

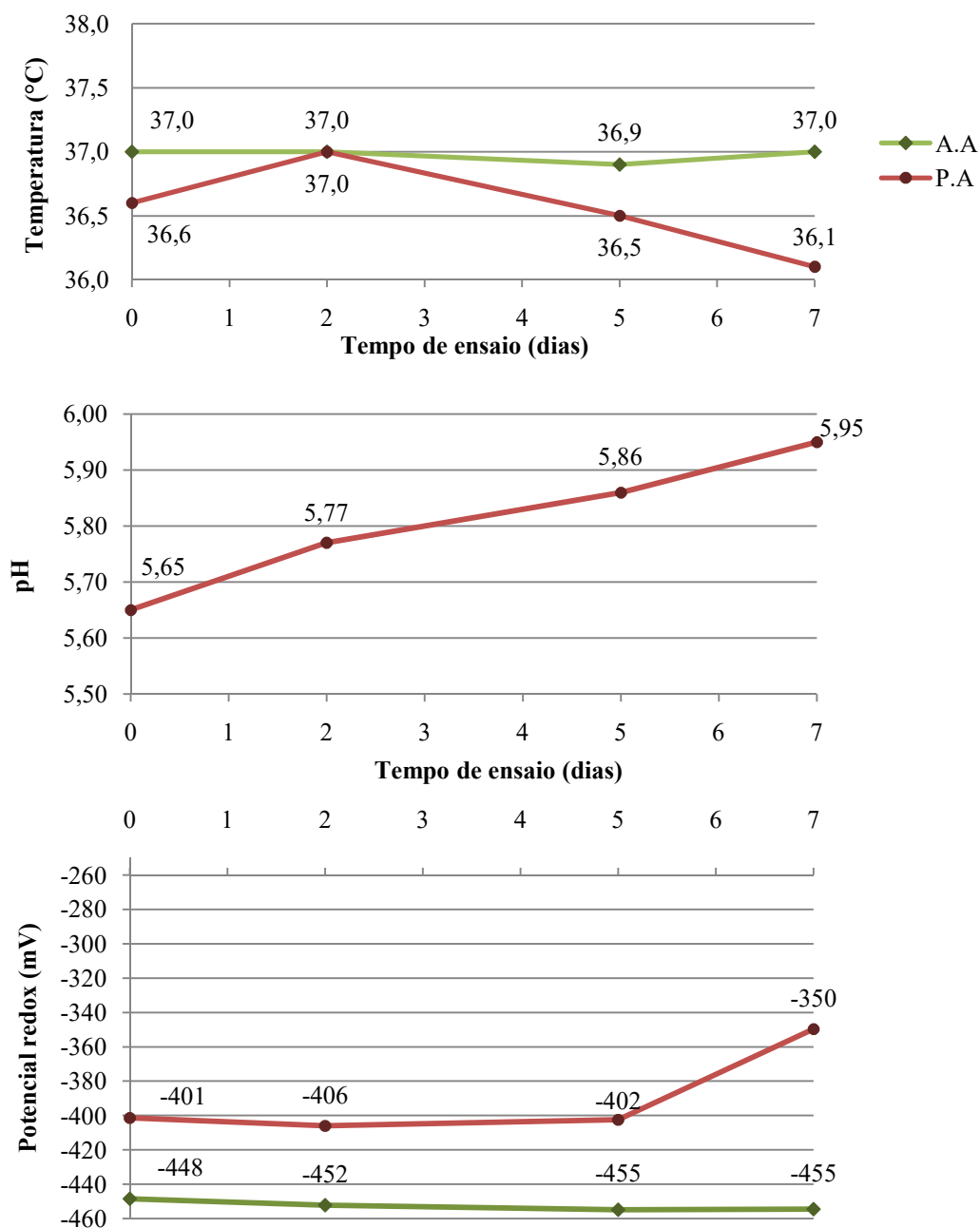


Figura 3.8 - Variação da temperatura, pH e potencial redox do interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.6. (A.A: Valores anteriores à alimentação; P.A: Valores posteriores à alimentação).

A temperatura no interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.6, apresentou uma média e um desvio-padrão de $36,8 \pm 0,33$ °C. Verificou-se uma ligeira perturbação aquando da introdução dos afluentes, com exceção da segunda alimentação ($t=2d$), na qual não se verificou oscilação de temperatura. Contudo o máximo decréscimo ocorrido não foi além de $0,9$ °C ($t=7d$).

A manutenção de uma temperatura constante foi alcançada através do aquecimento prévio do alimento, até uma temperatura próxima dos 37 °C. Após a alimentação o regresso à temperatura inicial (37 °C) foi muito rápida, mantendo-se estável durante o restante tempo de ensaio.

A média de pH foi de $5,81 \pm 0,13$, tendo-se observado um aumento consistente deste parâmetro desde o início do ensaio até ao final do mesmo (figura 3.8).

Os valores de potencial redox (figura 3.8) que foram obtidos ao longo do ensaio E.6 foram propícios à manutenção de um ambiente fortemente redutor.

Observou-se um aumento deste parâmetro logo após cada uma das alimentações, o que é justificável pela entrada de oxigénio durante o procedimento.

O potencial de oxidação redução foi diminuindo gradualmente ao longo do ensaio, alcançando o seu valor mais baixo no último dia de ensaio ($t=7d$), demonstrando uma boa capacidade de manutenção do ambiente redutor.

O valor mais elevado foi de -349 mV ($t=7d$), o que sendo claramente redutor revela um aumento da estabilidade do meio, em relação ao ensaio anterior (E.7).

3.3.2.2. Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes

Os resultados da caracterização dos afluentes e efluentes relativos ao ensaio E.6 são apresentados nas figuras 3.9 e 3.10.

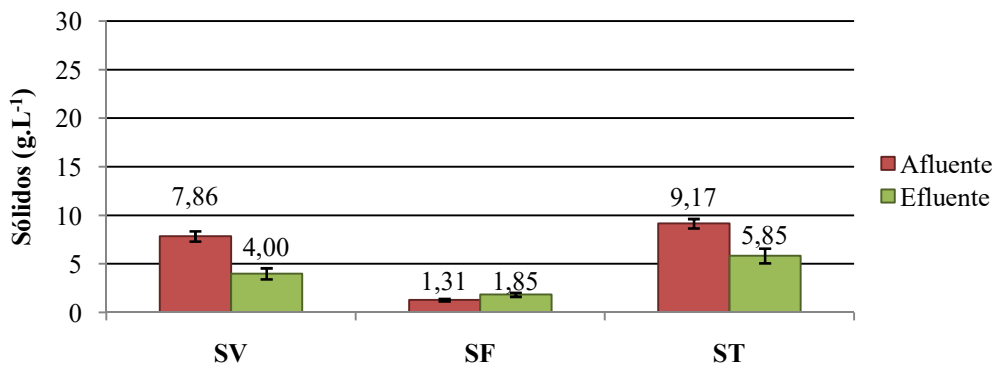


Figura 3.9 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.6.

A eficiência de remoção de SV foi de 49,1% (de 7,86 para 4,00g.L⁻¹) e de ST foi de 36,2% (9,17 para 5,85 g.L⁻¹), sendo inferior à remoção alcançada no ensaio E.7. Relativamente aos sólidos fixos, verificou-se um aumento de 29,2% (de 1,31 para 1,85 g.L⁻¹) nos efluentes em relação aos afluentes, tal como foi verificado no ensaio E.7.

A percentagem de remoção de CQOt (figura 3.10) alcançada no presente ensaio foi de 46,5% (de 86,7 para 46,3 gO₂.L⁻¹) e de CQOs de 0,84% (de 12,0 para 11,9 gO₂.L⁻¹).

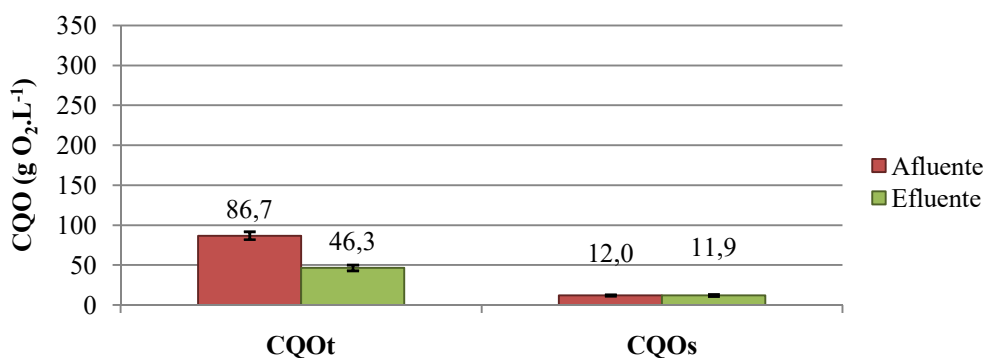


Figura 3.10 - Teores médios e desvios-padrão da CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.6.

3.3.2.3. Quantificação e caracterização do biogás

Os valores de caudal médio de biogás, caudal de bioH₂ e rendimento de produção de biogás, relativamente à CQOs removida e aos SV removidos são apresentados na figura 3.11

Neste ensaio obteve-se um caudal médio de biogás de 188 mL.d⁻¹ (89,5 mL.L⁻¹.d⁻¹), resultando num volume total de produção de 1,34×10³ mL. Este valor foi superior ao obtido no ensaio E.7. Este incremento pode ter-se devido a uma maior estabilidade da população microbiana, dado o bio-reator se encontrar a operar durante um maior número de dias desde a aplicação do pré-tratamento. Apesar deste incremento o caudal obtido no presente ensaio continua a ser reduzido em comparação com outros estudos realizados no âmbito da produção de bioH₂ (Paudel *et al.*, 2016; Stavropoulos *et al.*, 2017).

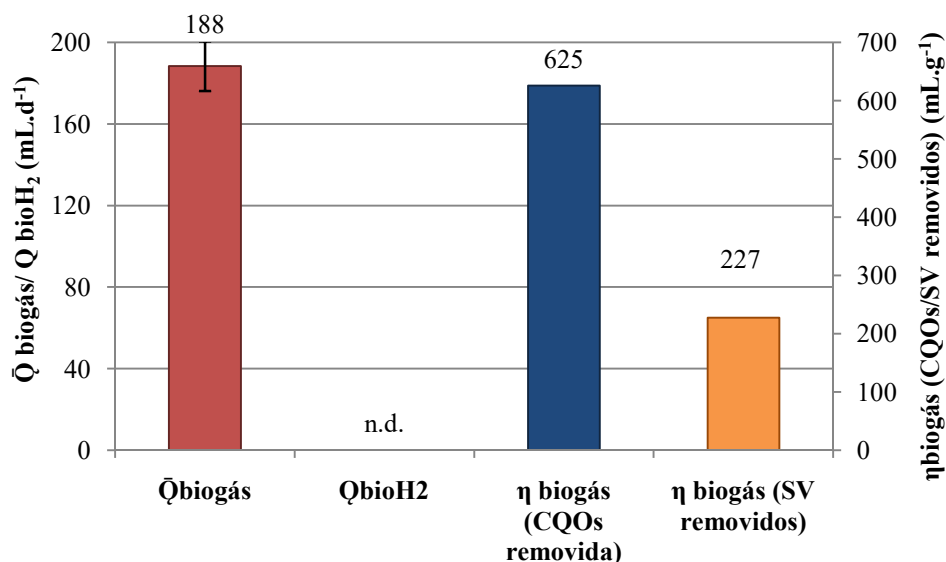


Figura 3.11 - Caudal de biogás/bioH₂ e rendimento de produção de biogás por CQOs removida e SV removidos, relativos ao ensaio E.6. (n.d. - Não detetado)

O rendimento de produção de biogás relativamente à CQOs e aos SV removidos foi de 625 mL.g⁻¹ CQOs e 227 mL.g⁻¹ SV, respetivamente.

A variação dos teores de CH₄, CO₂, O₂ e H₂, ao longo do ensaio E.6 é apresentada na figura 3.12.

Tal como ocorreu no ensaio E.7, não foi detetada a presença de H₂ nem de O₂. Tal pode ter ocorrido devido tanto ao valor de pH como de TRH, que poderão ter permitido a presença de bactérias metanogénicas (Paudel *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2010). Outro possível argumento prende-se com o tempo de aclimação concedido à população microbiana. Embora existam estudos onde é alcançado a estabilidade da população microbiana (com consequente produção de bioH₂) ao fim de 3–7 dias (Hafez *et al.*, 2010), o tempo de ensaio pode não ter sido suficiente (o bio-reator operou pouco tempo com as mesmas condições).

Relativamente ao metano, o teor máximo registado foi de 83,6% v/v (t=4d), diminuindo a sua percentagem no biogás até ao final do ensaio (t=7d), onde se obteve um teor de 81,1% v/v.

O CO₂ aumentou o seu teor desde o início até ao final do mesmo, onde se alcançou a percentagem máxima de 18,9% v/v.

O comportamento observado em termos de evolução do teor de CH₄ e CO₂ foi semelhante ao do ensaio E.7, onde se verificou um aumento da percentagem de CO₂ no biogás simultaneamente à diminuição do teor de CH₄, neste caso a partir do quarto dia de ensaio, demonstrando assim uma tendência para o favorecimento da fase fermentativa.

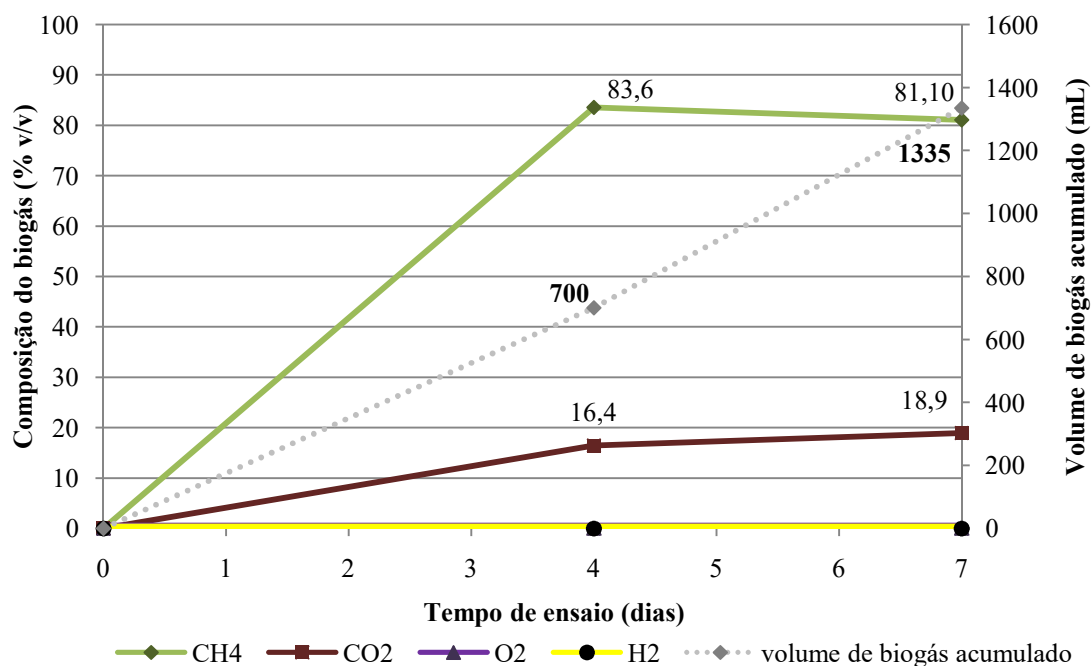


Figura 3.12 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás, ao longo do ensaio E.6.

3.3.3. ENSAIO E.4 (pH 4)

3.3.3.1. Parâmetros

Os dados referentes ao registo dos parâmetros operacionais, dentro do bio-reactor (temperatura, pH e potencial redox) ao longo do ensaio E.4 encontram-se ilustrados na figura 3.13. O registo foi realizado antes (A.A) e depois (P.A) de cada alimentação, a partir dos valores registados nos módulos digitais, para a temperatura e potencial redox. Os valores de pH são relativos aos efluentes.

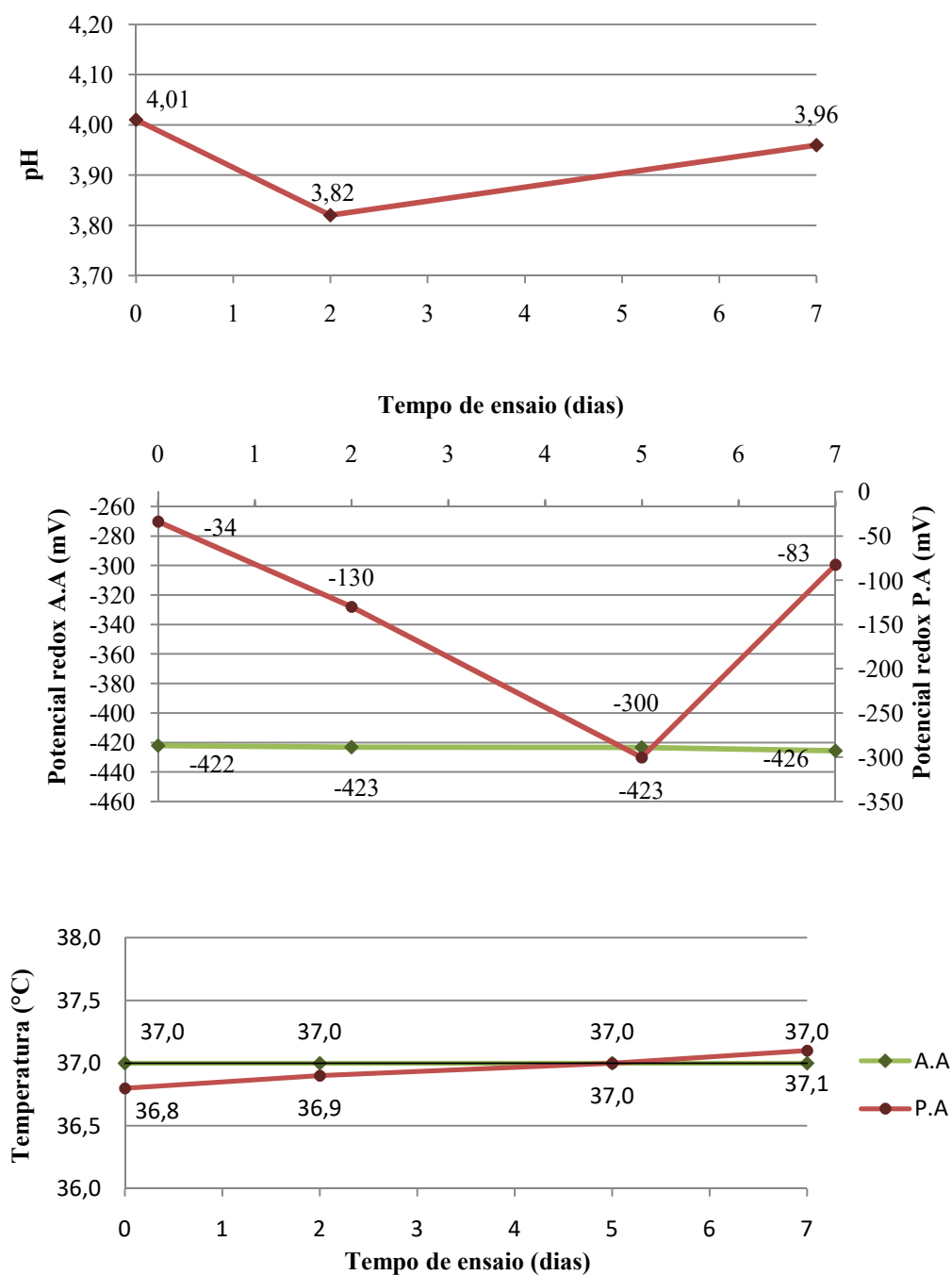


Figura 3.13 - Variação da temperatura n interior do bio-reator, ao longo do ensaio E.4. (A.A: Valores anteriores à alimentação; D.A: Valores posteriores à alimentação)

O ensaio E.4 apresentou uma média e um desvio-padrão da temperatura de $37,0 \pm 0,08$ °C, tendo variado entre 36,8 °C (t=0d), após a alimentação, e os 37,1 °C (t=7d).

A média de pH no interior do bio-reator (figura 3.13) foi de $3,93 \pm 0,08$, oscilando entre 4,01 (t=0d) e 3,96 (t=7d). Verificou-se um decréscimo de pH entre o início do ensaio (t=0d) e o segundo dia. Esta diminuição pode ter-se devido à acumulação de CO₂ e AGV's.

O potencial redox (figura 3.13) foi o parâmetro operacional que apresentou mais variação no ensaio E.4. Pode observar-se que nos momentos em que se realizaram as alimentações do bio-reator foram registados aumentos significativos do potencial redox ($t=0d$: de -422 mV para -34 mV; $t=2d$: de -423 mV para -130 mV; $t=7d$: de -426 mV para -82,7 mV) com exceção da terceira alimentação ($t=5d$) em que o aumento não foi tão significativo. Após as alimentações, o bio-reator recuperou o seu potencial redutor, mantendo-se consideravelmente constante entre alimentações. O valor médio e o desvio-padrão do potencial redox foram de -424 ± 2 mV.

3.3.3.2. Caracterização físico-química dos afluentes e efluentes

Na figura 3.14 são apresentados os teores médios e respetivos desvios-padrão de SV, SF e ST, resultantes da caracterização dos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.4.

Neste ensaio obteve-se uma eficiência de remoção de SV 14,1% (de 10,7 para 9,19 g.L⁻¹), verificando-se que a fração de matéria orgânica convertida ou estabilizada durante o processo fermentativo é francamente inferior aos 52% obtidos por Zhu *et al.* (2008), num estudo onde avaliaram o potencial da fermentação de resíduos de batata para produção de bioH₂ a 35 °C, pH 5,5 e TRH de 6 dias.

A taxa de remoção de ST foi de 11,8% (de 12,0 para 10,6 g.L⁻¹). Quanto aos SF, verificou-se um aumento da sua concentração nos efluentes em relação aos afluentes de 6,40% (de 1,3 para 1,40 g.L⁻¹).

Nos resultados de SF obtidos nos três ensaios, as concentrações no efluente foram sempre superiores às do afluente. A explicação para estes resultados prende-se com a redução do teor de SV, que causa um aumento da proporção de SF nos ST, bem como à reduzida fixação de minerais na biomassa.

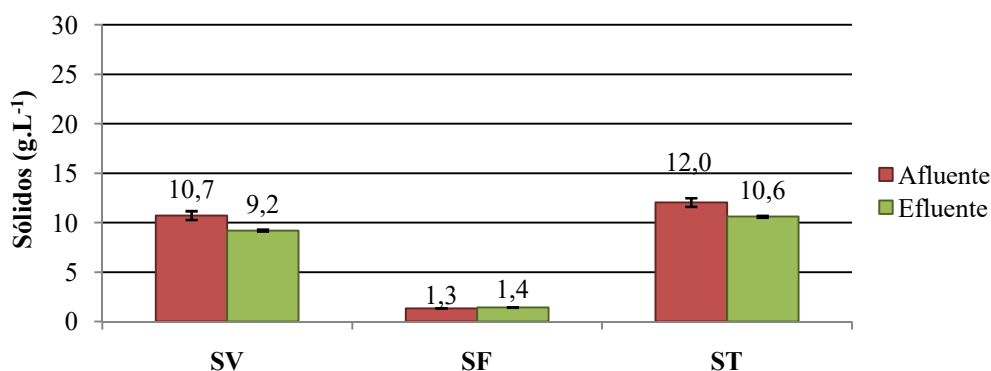


Figura 3.14 - Teores médios e desvios-padrão de sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SF) e sólidos totais (ST) nos afluentes e efluentes do bio-reator, relativos ao ensaio E.4.

Os teores médios de CQOt e CQOs, bem como os respetivos desvios-padrão nos afluentes e efluentes, relativos ao ensaio E.4 encontram-se apresentados na figura 3.15.

Relativamente à CQOt, obteve-se uma eficiência de remoção de 12,3% (de 97,3 para 85,3 gO₂.L⁻¹). Este resultado é próximo dos 19,0% de remoção obtidos por Zhu *et al.* (2008). No entanto encontra-se consideravelmente abaixo dos 68,0% e 68,2% obtidos por Mohanakrishna *et al.* (2011) e O-Thong *et al.* (2007), respetivamente. Zhu *et al.* (2008), utilizaram como substrato resíduos de casca de batata, substrato semelhante ao utilizado no presente estudo, o que pode explicar a proximidade dos resultados obtidos. Em contrapartida Mohanakrishna *et al.* (2011) utilizaram um extrato obtido a partir da trituração de diversos vegetais (tomate, cenoura, beterraba, couve, batata, entre outros) o que pode ter resultado na utilização da fração mais biodegradável dos vegetais, logo numa mais elevada eficiência de remoção. O-Thong *et al.* (2007) utilizaram um substrato de mais difícil biodegradação (efluente contendo óleo de palma), no entanto realizaram a suplementação do meio com Fe, N e P, que segundo os autores permitiu melhorar os resultados em termos de produção de bioH₂ bem como de remoção de CQOt. O facto de o bio-reator ter operado em condições termófilas (60 ± 1 °C) também pode ter tido uma influência positiva no aumento da remoção de CQOt (Yasin *et al.*, 2013).

A eficiência de remoção de CQOs obtida foi de 11,0% (de 14,3 para 12,6 gO₂.L⁻¹).

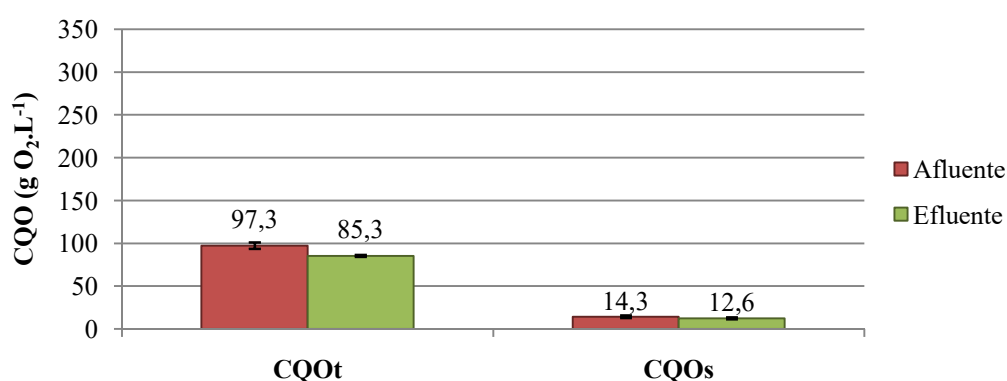


Figura 3.15 - Teores médios e desvios-padrão de CQOt e CQOs nos afluentes e efluentes no bio-reator, relativos ao ensaio E.4.

3.3.3.3. Quantificação e caracterização do biogás

A figura 3.16 apresenta os caudais médios, e os rendimentos de produção de biogás e bioH₂, relativamente à CQOs e aos SV removidos. Dada a heterogeneidade da produção, tanto de biogás como de bioH₂, ao longo do ensaio, optou-se por dividir cada um dos parâmetros num par de colunas: a coluna da esquerda diz respeito ao caudal médio e a da direita ao caudal máximo.

Neste ensaio obteve-se um caudal médio de biogás de 50,7 ± 54,1 mL.d⁻¹ (caudal volumétrico médio: 24,1 ± 25,8 mL.L⁻¹.d⁻¹) e um caudal máximo de 89,0 mL.d⁻¹ (caudal volumétrico

máximo: 42,4 mL.L⁻¹.d⁻¹). O volume total de produção de biogás foi de 290 mL. Estes caudais são substancialmente inferiores aos obtidos nos anteriores ensaios E.6 e E.7, onde se obtiveram os caudais de 188 e 50,4 mL.d⁻¹, respetivamente. Em relação a outros estudos consultados, verificou-se uma taxa de produção substancialmente reduzida. Stavropoulos *et al.* (2016) e Paudel *et al.* (2017) obtiveram caudais volumétricos de biogás de $2,7 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^3$ mL.L⁻¹.d⁻¹. A reduzida produção de biogás deste ensaio pode ter-se devido à diminuição abrupta de pH (de 6 para 4), o que pode ter constituído um fator de perturbação da população microbiana. Outra possível explicação prende-se com a composição do substrato utilizado, pobre em açúcares facilmente biodegradáveis, fator de capital importância no processo fermentativo (Sinha *et al.*, 2016; Ghimire *et al.*, 2015b).

Relativamente aos caudais de bioH₂, obteve-se um caudal médio de $38,1 \pm 49,3$ mL.d⁻¹ ($18,1 \pm 23,5$ mL.L⁻¹.d⁻¹) e um caudal máximo de 73,0 mL.d⁻¹ ($34,8$ mL.L⁻¹.d⁻¹), com a obtenção de um volume total de 224 mL.

Estes resultados são consideravelmente inferiores ao intervalo de resultados obtidos por Sinha *et al.* (2016) ($2,3 \times 10^3$ e $7,2 \times 10^3$ mL.L⁻¹.d⁻¹), a partir da fermentação anaeróbia de melaço de cana-de-açúcar, glucose, efluente de uma destilaria e águas residuais ricas em amido.

A reduzida produção de bioH₂, pode ter-se devido à reduzida carga aplicada e ao elevado TRH utilizados no presente estudo. O aumento da carga aplicada e diminuição do TRH poderiam, eventualmente, resultar no aumento da taxa de produção de bioH₂. Cisnero-Pérez *et al.* (2017) investigaram a influência da carga aplicada (intervalo estudado: 24–60 gCQO.L⁻¹.d⁻¹) e TRH (intervalo estudado: 2–10h) na taxa volumétrica de produção de bioH₂, utilizando glucose como substrato, e um pH de 5,5, tendo obtido os melhores resultados com a carga mais elevada (60 gCQO.L⁻¹.d⁻¹) e TRH de 6h. Com valores de TRH mais reduzidos os autores verificaram uma diminuição da taxa de produção, possivelmente causada pela ocorrência de *washout* celular. Um menor TRH leva ao aumento do fluxo de substrato para o interior do bio-reator, aumentando a taxa de conversão que pode promover o crescimento de bactérias produtoras de hidrogénio, em detrimento das hidrogenotróficas, dada a menor taxa específica de crescimento das primeiras em relação às segundas.

A nível do rendimento de produção de biogás relativamente à CQOs removida, obteve-se um rendimento médio de $88,3 \pm 94,1$ mL.g⁻¹ CQOs e um rendimento máximo de 155 mL.g⁻¹ CQOs.

Relativamente ao rendimento de produção de biogás por massa de SV removidos obteve-se um valor médio de $87,1 \pm 115$ mL.g⁻¹ SV e máximo de 169 mL.g⁻¹ SV.

Os rendimentos de produção de bioH₂, médio e máximo, em relação à CQOs removida, foram de $63,7 \pm 82,4$ e 122 mL.g^{-1} CQOs, respetivamente.

O rendimento de produção de bioH₂, relativamente à CQOt, apresentou um valor de $0,80 \text{ mL.g}^{-1}$ CQOt, nos primeiros dois dias, e $17,9 \text{ mL.g}^{-1}$ CQOt, no restante tempo de ensaio. Estes resultados enquadram-se com os resultados obtidos por Radjaram & Saravanane (2011), que alcançaram rendimentos de produção de bioH₂ entre 2,58 e $40,6 \text{ mL.g}^{-1}$ CQO, a partir de lamas de ETAR. No entanto, estes valores são reduzidos em comparação com os obtidos por Kongkliang *et al.* (2015) ($48,2$ e $81,5 \text{ mL.g}^{-1}$ CQO), que investigaram o potencial bioquímico da produção de bioH₂, em condições termófilas (60 °C), a partir de águas residuais de processamento de arroz, mandioca e milho, ricas em amido. Neste estudo não se encontra especificado a que fração estão associados os valores de CQO, pelo que se assumiu que eles se referem à amostra total e não apenas à fração solúvel.

Quanto aos rendimentos de produção relativo aos SV removidos, obteve-se um rendimento médio de $72,0 \pm 93,1 \text{ mL.g}^{-1}$ SVe um rendimento máximo de 138 mL.g^{-1} SV.

Os reduzidos rendimentos de produção registados no presente trabalho podem ter sido produto da baixa biodegradabilidade da casca de batata que se reflete na reduzida produção de bioH₂. Ghimire *et al.* (2015b) demonstraram que o rendimento de produção de bioH₂ depende tanto do teor de açúcares do substrato, bem como da sua biodegradabilidade. Num estudo onde analisaram o potencial biológico de hidrogénio de vários substratos complexos (resíduos de feno, resíduos de batata e abóbora, sangue desidratado, águas residuais de lagar de azeite e excrementos de búfalo) obtiveram um intervalo de resultados entre 46,0 e 171 mL.g^{-1} SV. Os resultados mais elevados foram obtidos a partir dos resíduos de batata e abóbora, sendo este o resíduo mais rico em açúcares e de maior biodegradabilidade. Em todos os ensaios, a produção estabilizou ao final de 6 dias, com exceção do ensaio onde foram utilizados excrementos de búfalo, que necessitou de 10 dias, dada a baixa biodegradabilidade do substrato em questão. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos no presente estudo, visto que a produção de biogás aparenta ter começado a estabilizar nos últimos dias de ensaio, pelo que teria sido aconselhável prolongar o ensaio durante mais tempo. Adicionalmente, a utilização de um co-substrato mais facilmente biodegradável e mais rico em açúcares poderia ter ajudado a colmatar a natureza da casca de batata, enquanto substrato orgânico principal.

Na literatura são relatados valores de rendimentos de produção muito variáveis, desde 1,00 a 559 mL.g^{-1} SV, obtidos a partir resíduos alimentares e águas residuais, palhas pré-tratadas com explosão por vapor e palhas pré-tratadas através de fervura com HCl (Tawfik & El-Qelish, 2012; Li & Chen, 2007; Fan *et al.*, 2006). Esta amplitude de resultados pode ser justificada pela

dependência que as vias fermentativas, e consequente produção de bioH_2 , têm do tipo de substrato (Ghimire *et al.*, 2015b; Li & Fang, 2007), bem como dos parâmetros operacionais aplicados (pré-tratamento a que os substratos são submetidos, temperatura de operação do bioreator, razão C/N/P do substrato, carga orgânica aplicada entre outros fatores) (Guo *et al.*, 2010).

Os resultados relativos aos primeiros dois dias de ensaio são consideravelmente inferiores aos do restante período de tempo. Isto pode dever-se à adaptação da população microbiana às novas condições de pH, dado o acentuado decréscimo deste parâmetro relativamente ao ensaio anterior (pH=6). Para além disso, a produção de bioH_2 (figura 3.17) indica que a situação de equilíbrio dinâmico ainda não teria sido atingida no final do ensaio, uma vez que a sua produção continuava em crescimento. Teria sido desejável que o ensaio tivesse sido prolongado por um período de tempo superior.

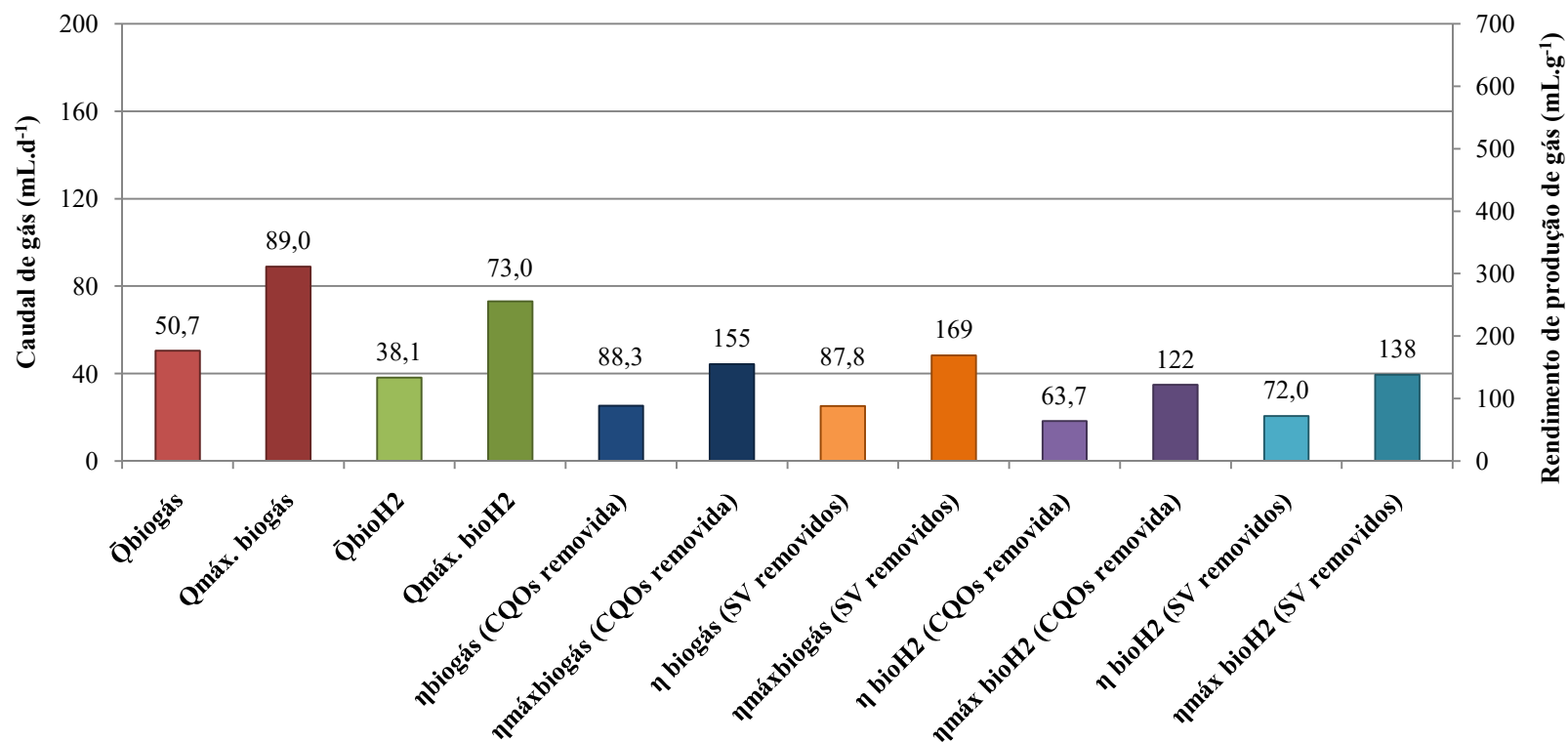


Figura 3.16 - Caudais e rendimentos de produção (médios e máximos) de biogás e bioH₂, por unidade de massa de CQOs removida e SV removidos.

Tabela 3.5 - Comparação dos resultados de produção de hidrogénio com vários estudos

Substrato	Pré-tratamento do inóculo	Carga aplicada	pH	Temp. (°C)	TRH (h)	Caudal volumétrico máximo (mL H ₂ . L ⁻¹ .d ⁻¹)	η_{H_2} (mL H ₂ .g ⁻¹ SV _{adic})	η_{H_2} (mL H ₂ .g ⁻¹ CQO _{adic})	H ₂ % v/v	Taxa máxima de produção de biogás (mL.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Referência
Casca de batata	Choque térmico: – 90°C durante 45 min.	10 g CQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	3,93 ± 0,08	37,0 ± 0,08	144	34,8	72,0 ^a	2,83 ^b	86,0	42,4	Presente estudo
Casca de batata	Choque térmico: – 90°C durante 45 min.	10 g CQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	5,81 ± 0,13	36,8 ± 0,33	144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	89,5	Presente estudo
Casca de batata	Choque térmico: – 90°C durante 45 min.	10 g CQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	6,78 ± 0,08	36,4 ± 0,09	144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	68,6	Presente estudo
Mistura de produtos lácteos	–	–	5	37 ± 2	144	760	40,6	24,3	28,7	2,7×10 ³	Stavropoulos <i>et al.</i> , 2016
Resíduos orgânicos domésticos e águas castanhas	Choque térmico: – 90°C durante 30 min.	106 g SV.L ⁻¹ .d ⁻¹	5,0 – 5,5	37	8	440	99,8	–	32,3	1,4×10 ³	Paudel <i>et al.</i> , 2017
Águas residuais provenientes da cozedura de milho (<i>Nejayote</i>)	Tratamento aplicado de acordo com a patente (MX/a/2016/014659) (Aclimatização com glucose durante 2 meses)	–	5,5	35	–	4,46	115 mL	–	73,4	–	García-Depraect <i>et al.</i> , 2017
Mistura de resíduos alimentares (vegetais, massa e arroz cozinhados, pão, etc.)	Choque térmico: – 105°C durante 4h	2,0 g SV.L ⁻¹ .d ⁻¹	Sem controlo (pH _{in} =7, pH _{ef} =4,7 ± 0,2	55 ± 2	6	210	105 ± 14,9	–	59,4	–	Ghimire <i>et al.</i> , 2015b

^a - mL H₂.g⁻¹.SV_{removidos}

^b - mL H₂.g⁻¹.CQO_{sremovida}

^c - mol H₂.kg⁻¹CQO_{removida}

n.d. - Não detetado

Tabela 3.5 - Comparação dos resultados de produção de hidrogénio com vários estudos (cont.)

Substrato	Pré-tratamento do inóculo	Carga aplicada	pH	Temp. (°C)	TRH (h)	Caudal volumétrico máximo (mL H ₂ . L ⁻¹ .d ⁻¹)	η_{H_2} (mL H ₂ .g ⁻¹ SV _{adic})	η_{H_2} (mL H ₂ .g ⁻¹ CQO _{adic})	H ₂ % v/v	Taxa máxima de produção de biogás (mL.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Referência
Soro de leite + estrume de búfalo	Choque térmico	2,1 g SV.L ⁻¹ .d ⁻¹	4,8–5,0	55 ± 2	8 – 12	215 ± 62,1	152 ± 43,9	–	58,0	–	Ghimire <i>et al.</i> , 2017
Melaço de cana	–	–	6,5 ± 2	37	–	2,7×10 ³	–	9,47 ^c	–	–	Sinha <i>et al.</i> , 2016
Lama granular anaeróbia obtida em estação de tratamento de águas residuais de indústria de frutose	Choque térmico: – 95°C, 1h (Aclimatização durante 3 dias)	10 – 40 g açúcares totais.L ⁻¹	5,6 ± 0,1	35 ± 1	8	20×10 ³	–	–	48,2	–	Lin <i>et al.</i> , 2016

^a - mL H₂.g⁻¹SV_{removidos}

^b - mL H₂.g⁻¹CQO_{sremovida}

^c - mol H₂.kg⁻¹CQO_{removida}

n.d. - Não detetado

Na figura 3.17 apresenta-se a variação dos teores de CH₄, CO₂, O₂ e H₂, ao longo do ensaio E.4.

Tal como ocorreu nos anteriores ensaios, não foi detetada a presença de O₂.

O teor máximo de metano registado foi de 60,2% v/v, no segundo dia de ensaio, diminuindo a sua concentração no biogás até ao final do ensaio (t=7d), onde se obteve um teor de mínimo de 11,2% v/v.

O teor máximo de CO₂ registado foi de 9,82% v/v, no segundo dia, diminuindo a sua percentagem até um mínimo de 2,79% no sétimo dia de ensaio.

Neste ensaio, ao contrário dos anteriores, foi detetada a presença de H₂. Uma possível explicação para presença de hidrogénio neste ensaio, ao contrário dos dois ensaios anteriores, prende-se com o reduzido valor de pH, o que torna as condições ambientais inadequadas para a sobrevivência das bactérias metanogénicas e favorece a atividade das bactérias fermentativas (Ghimire *et al.*, 2015a; Kumar *et al.*, 2015).

O teor de hidrogénio aumentou ao longo de todo o ensaio, tendo-se registado o valor máximo de 86,0% v/v no sétimo dia de ensaio. Este resultado é elevado em comparação com os valores relatados na literatura consultada. García-Depraect *et al.* (2017) referem um teor máximo de bioH₂ de 73,4% v/v, obtido a partir da fermentação no escuro de águas residuais provenientes da cozedura de milho (ricas em amido) com pH controlado (5,5) e temperatura na ordem dos 35 °C, Ghimire *et al.* (2015b) reportam um teor de H₂ de 59,4% v/v, obtido a partir da fermentação no escuro de resíduos alimentares (mistura de vegetais, pão, massa e arroz cozinhados, entre outros) em condições termófilas (55 °C) e sem controlo de pH, embora o pH dos efluentes fosse ácido (pH_{ef}=4,7 ± 2). Resultados inferiores são indicados noutros estudos: 28,7% v/v, a partir da fermentação de produtos lácteos em condições mesófilas (37 °C) a pH 5,0 (Stavropoulos *et al.*, 2016), e 32,3% v/v, a partir da fermentação de uma mistura de águas castanhas e resíduos orgânicos domésticos (Paudel *et al.*, 2017).

Embora o caudal de bioH₂ tenha sido reduzido, o elevado teor de H₂ do biogás torna a casca de batata e o inóculo, utilizados no presente estudo, interessantes para utilização em outros estudos no âmbito da produção de bioH₂.

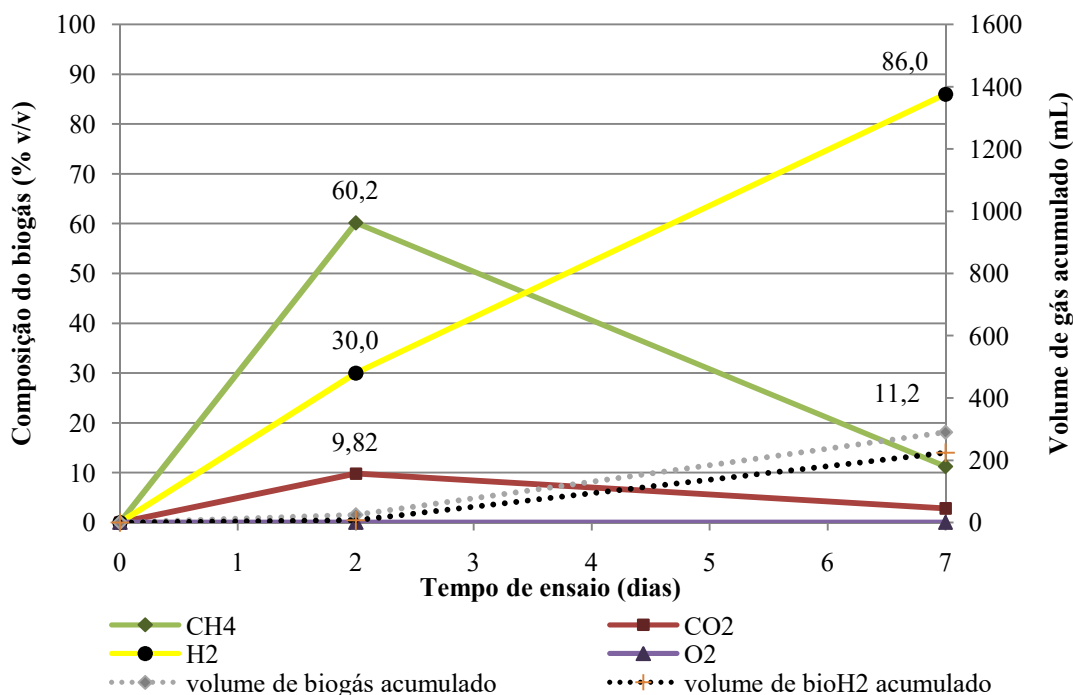


Figura 3.17 - Variação da composição do biogás e volume acumulado de biogás e bioH₂, ao longo do ensaio E.4.

3.3.4. PRINCIPAIS RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

Na presente secção pretende-se comparar os principais resultados dos ensaios de fermentação anaeróbia, de modo a tentar compreender a influência de cada um dos valores de pH estudados (pH 7, 6 e 4), no processo em questão.

Na tabela 3.6 são apresentados os parâmetros de eficiência da fermentação anaeróbia: eficiência de remoção de SV e de CQOs, rendimentos de produção de biogás e bioH₂, relativamente aos SV e CQOs removidos e percentagem máxima de CH₄ e H₂.

Relativamente à eficiência de remoção de SV, o ensaio que apresentou melhor desempenho foi o E.7, com 66,9%, seguido do ensaio E.6, com uma eficiência de 49,1%. Os resultados mais reduzidos foram relativos ao ensaio E.4, com 14,1% de remoção de SV.

Quanto à eficiência de remoção de CQOs, os valores mais elevados foram obtidos no ensaio E.7, com 15,0% de remoção, seguido do ensaio E.4 com 11,0% e por último, o ensaio E.6 com uma percentagem de remoção de CQOs de apenas 0,84%.

O rendimento de produção de biogás, em relação à CQOs_{removida}, mais elevado foi alcançado no ensaio E.6, com um rendimento de 625 mL.g⁻¹ CQOs_{removida}. O segundo rendimento mais

elevado foi obtido no ensaio E.7 e o menor rendimento no ensaio E.4, com 298 e 88,3 mL.g⁻¹ CQOs_{removida}, respetivamente.

Em termos de rendimento de produção de biogás, relativo aos SV_{removidos}, verificou-se uma eficiência mais elevada do ensaio E.6, com 227 mL.g⁻¹ SV_{removidos}. O ensaio E.4 apresentou o segundo rendimento mais elevado e por ultimo o ensaio E.7, com 87,8 e 74,7 mL.g⁻¹ SV_{removidos}, respetivamente.

Relativamente aos rendimentos de produção de bioH₂, só tendo sido detetada presença deste gás no ensaio E.4, os rendimentos de produção relativos aos SV_{removidos} e CQOs_{removida}, foram de 72,0 mL.g⁻¹ SV_{removidos} e 63,7 mL.g⁻¹ CQOs_{removida}.

Na composição do biogás, verificou-se um claro decréscimo da percentagem máxima de CH₄, com a diminuição do pH. A percentagem máxima de CH₄ registada no ensaio E.7 foi de 97,8% v/v (t=2 d), no ensaio E.6 foi de 83,6% v/v (t=4d) e no ensaio E.4 de 60,2% v/v (t=2d).

Os teores de CH₄ relativos aos ensaios E.7 e E.6 foram muito elevados, tendo-se registado percentagens mínimas no biogás de 93,7% v/v e 81,1% v/v, respetivamente, no final do ensaio (t=7d). A diminuição do pH para 4,0 (E.4) possibilitou a diminuição dos teores de CH₄ no biogás para mínimos de 11,2% v/v, no final do ensaio (t=7d).

Quanto à produção de bioH₂, foi detetado apenas no ensaio E.4, tendo-se registado um teor mínimo de 30,0% v/v, no início do ensaio (t=2d) e um teor máximo de 86,0% v/v no final do ensaio (t=7d). O pH mais ácido aplicado no ensaio E.4 permitiu limitar a atividade das bactérias metanogénicas, que não foram eliminadas com o pré-tratamento aplicado, permitindo a obtenção de elevados teores de bioH₂ e reduzidas concentrações de CH₄.

Kumar *et al.* (2016) investigaram o efeito do pH (5,5) e aplicação de pré-tratamento térmico a dois tipos de inóculo (mesófilo e termófilo). O mesófilo gerou CH₄ (tanto em condições mesófilas como termófilas) e o termófilo não gerou CH₄, sendo sugerido que o tipo de inóculo utilizado tem um papel mais fundamental, no processo de fermentação no escuro, do que o pH e pré-tratamento utilizado, no entanto os resultados obtidos no presente estudo evidenciam o papel crucial do pH no controlo da actividade metanogénica. Cisnero-Pérez *et al.* (2017) vêm dar o seu contributo no sentido da valorização do pré-tratamento em função do tipo de inóculo utilizado, indicando a importância da desagregação de flocos biológicos aquando da utilização da utilização de inóculos de natureza granular, de modo a possibilitar a ação do agente de tratamento utilizado sobre as bactérias metanogénicas, previamente protegidas no interior dos grânulos.

O pré-tratamento utilizado no presente trabalho, não foi capaz de suprimir eficazmente as bactérias metanogénicas presentes no inóculo. Seria interessante realizar uma etapa de desagregação granular antes da aplicação do pré-tratamento, ou a utilização de outro tipo de pré-tratamento, de modo a poder avaliar a adequabilidade do inóculo utilizado, bem como das condições operacionais utilizadas, com os pH's 7,0 e 6,0. Estes valores de pH são referidos como estando dentro da gama favorável à produção de bioH₂ (Ghimire *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2017) bem como à actividade metanogénica (Elreedy *et al.*, 2017; Ward *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2007), sendo essencial a eliminação deste grupo de bactérias para que seja possível produzir bioH₂ e quantidades consideráveis, com estes valores de pH.

Tabela 3.6 - Resumo dos parâmetros de controle avaliados durante os ensaios de fermentação no escuro

pH	ORP	SV	CQOs	Rendimento de Biogás		Rendimento de bioH ₂		CH ₄	H ₂
	mV	Remoção (%)		mL.g CQO _s ⁻¹	mL.g SV ⁻¹	mL.gCQOS ⁻¹	mL.gSV ⁻¹	% _{máx} v/v	
7	[-449; -275]	66,9	15,0	298	74,7	n.d.	n.d.	97,8	n.d.
6	[-448 ; -350]	49,1	0,84	625	227	n.d.	n.d.	83,6	n.d.
4	[-426 ; -34]	14,1	11,0	88,3	87,8	63,7	72	60,2	86,0

4. CONCLUSÕES

A caracterização elementar da casca de batata permitiu concluir que esta é constituída maioritariamente por água, tendo apresentado um teor de humidade de 89,0% (m/m bh); os restantes 11,0% (m/m bh) dizem respeito aos ST, dos quais 1,40% (m/m bh) são SF e 9,60% (m/m bh) são SV.

O resíduo utilizado apresenta ainda uma CQOt de $1,27 \times 10^3 \text{ gO}_2.\text{kg}^{-1}$ (bs) e teores médios de carbono, azoto e fósforo de 47,5% m/m 0,73% m/m e 0,21% m/m, respetivamente. Com base nestes valores foi determinada uma razão C/N de 58,6 gC.g^{-1} TKN.

Este estudo demonstrou a importância do pH e da aplicação de pré-tratamentos ao inóculo, na produção de bioH_2 através de DF, quando se utilizam culturas mistas. O pré-tratamento não foi eficiente na eliminação da totalidade das bactérias metanogénicas hidrogenotróficas, resultando na produção de biogás com elevados teores de CH_4 nos ensaios E.6 e E.7 (83,6 e 97,8% v/v, respetivamente). Nestes ensaios não se detetou bioH_2 no fluxo de biogás. Esta ineficiência na eliminação das bactérias hidrogenotróficas não tornou possível averiguar a adequabilidade destes valores de pH na produção de bioH_2 , através de DF de casca de batata.

No ensaio E.4, dado o baixo pH utilizado, foi possível reduzir o desempenho das bactérias metanogénicas hidrogenotróficas, com consequente redução do teor de CH_4 , até um valor mínimo de 11,2% v/v, e produção de elevados teores de bioH_2 (86% v/v). Em contrapartida, os caudais e rendimentos de produção de biogás e bioH_2 foram reduzidos ($34,8 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $2,83 \text{ mLH}_2.\text{g}^{-1} \text{ CQOs}_{\text{removida}}$, respetivamente). Valores tão reduzidos podem ser justificados pela descida abrupta do valor de pH (de 6 para 4), que pode ter interferido com o equilíbrio dinâmico da população microbiana. Teria sido importante realizar uma redução no valor de pH gradual ou ter concedido um maior tempo de aclimação, às novas condições.

Todos os ensaios resultaram em caudais médios reduzidos de biogás (E.7: $68,6 \text{ mL.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; E.6: $89,5 \text{ mL.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e, E.4: $24,1 \pm 25,8 \text{ mL.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

O rendimento de produção de biogás em relação aos SV mais elevados foi relativo ao ensaio E.6 ($227 \text{ mL.g}^{-1} \text{ SV}_{\text{removidos}}$), seguido do E.4 ($87,8 \text{ mL.g}^{-1} \text{ SV}_{\text{removidos}}$), e por fim o E.7 ($74,7 \text{ mL.g}^{-1} \text{ SV}_{\text{removidos}}$). Em termos de CQOs, o melhor resultado de produção de biogás foi obtidos com o ensaio E.6 ($625 \text{ mL.g}^{-1} \text{ CQOs}_{\text{removida}}$), seguido do ensaio E.7 ($298 \text{ mL.g}^{-1} \text{ CQOs}_{\text{removida}}$) e por fim o ensaio E.4 ($88,3 \text{ mL.g}^{-1} \text{ CQOs}_{\text{removida}}$). Os reduzidos caudais e rendimentos de produção de biogás e bioH_2 obtidos no presente estudo podem dever-se a uma composição nutricional pobre da casca de batata, como baixos teores de açúcares, bem como do TRH aplicado que pode ter sido demasiado elevado.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

5. PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

Ao longo deste trabalho foram levantadas algumas questões, para as quais não foram obtidas respostas, dada a limitação de tempo. Algumas destas questões foram as seguintes: caso o pré-tratamento tivesse eliminado a totalidade das bactérias metanogénicas, os ensaios E.6 e E.7 teriam produzido bioH₂? A utilização de cargas orgânicas mais elevadas resultaria em rendimentos de produção de biogás e bioH₂ mais elevados? A aplicação de TRH's mais reduzidos teria sido capaz de eliminar as bactérias metanogénicas? A utilização de um co-substrato nutricionalmente complementar da casca de batata teria resultado em melhores rendimentos em biogás e bioH₂?

Algumas sugestões para trabalhos futuros, utilizando o mesmo substrato, que poderão ser complementares ao estudo desenvolvido na presente dissertação serão:

- Investigação do efeito da submissão do inóculo a outros tipos de pré-tratamento, bem como da utilização de uma pré-etapa de desagregação de flocos biológicos, anterior à aplicação de calor para a eliminação de bactérias metanogénicas;
- Estudo da influência de valores de pH intermédios aos que foram utilizados;
- Estudo de diferentes cargas orgânicas aplicadas, tempos de residência hidráulicos e razões C/N/P;
- Realização do processo de fermentação no escuro na gama termófila;
- Avaliação da interacção entre vários parâmetros operacionais, como por exemplo o pH, TRH e a CA;
- Utilização de um co-substrato mais facilmente biodegradável e nutricionalmente complementares da casca de batata, como por exemplo águas residuais ricas em amido.

(Esta página foi deixada propositadamente em branco)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, A.A.V. (2011) *Optimization of dark fermentation processes for biohydrogen production from sugars*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal
- Absar, N., Zaidul, I.S.M., Takigawa, S., Hashimoto, N., Matsuura-Endo, C., Yamauchia, H., Noda, T. (2009) Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. *Food Chemistry*, 112: 57 - 62
- Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., Lyberatos, G. (2018) Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis. *Journal of Cleaner Production*, 174: 1054 - 1063
- Alves, M., Mota, M., Novais, J. (1995) Técnicas de caracterização e estudo de digestores anaeróbios. *Boletim de Biotecnologia*, 52: 25 - 39
- Anzola-Rojas, M. del P., da Fonseca S. G., da Silva C. C., de Oliveira V. M., Zaiat, M. (2015) The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, 5: 46 - 54
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K., Department, R. O. (2008) Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1813 - 1819
- ASTM D4239 (2002) Standard Test Methods for Sulfur in the Analysis Sample of Coal and Coke Using High-Temperature Tube Furnace Combustion Methods, American Society for Testing and Materials, USA
- ASTM D5373 (2002) Standard Test Methods for Instrumental Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Laboratory Samples of Coal and Coke, American Society for Testing and Materials, USA
- Azeitona, D.C.L. (2012) *Efeitos de Pré-tratamentos Térmicos na Digestão Anaeróbia Termófila de Resíduos de Casca de Batata*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal
- Babu, V.L., Mohan, S.V., Sarma, P.N. (2009) Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 3305 - 3312
- Balat, H., Kirtay, E. (2010) Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 7416 - 7426
- Balat, M., Balat, M. (2009) Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 3589 - 3603
- Bastidas-Oyanedel, J-R., Bonk, F., Thomsen, M.H., Schmidt, J. (2015) Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Reviews in Environmental and Biotechnology*, 14 (3): 473 - 498
- Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.A.S.S., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L. (2014) *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel*, 117 (A): 537 - 543

Bharathiraja, B., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Jayamuthunagai, J., Praveenkumar, R. (2016) Biohydrogen and biogas - An overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*, 185: 810 - 828

Bundhoo, M.A.Z., Mohee, R. (2016) Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 6713 - 6733

Carapinha L.C.M. (2012) *Efeito de Alguns Pré-tratamentos na Digestão Anaeróbia Mesofílica de Resíduos de Casca de Batata*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Carosia, M.F., dos Reis, C.M., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L. (2017) Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42 (15): 9600 - 9610

CCE 2000. Guia Técnico de Biogás. In: Energia, D.G.D. (ed.). Centro para a Conservação de Energia, Algs, 14-24; 42-44; 51-61

Choi, S.-H., Kozukue, N., Kim H.-J., Friedman M. (2016) Analysis of protein amino acids, non-protein amino acids and metabolites, dietary protein, glucose, fructose, sucrose, phenolic, and flavonoid content and antioxidative properties of potato tubers, peels, and cortexes (pulp). *Journal of Food Composition and Analysis*, 50: 77 - 87

Dareioti, M.A. & Kornaros, M. (2014) Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresource Technology*, 167: 407 - 415

Das, D., Khanna, N., Dasgupta, C.N. (2014) *Biohydrogen Production - Fundamentals and Technology Advances* [on-line]. Boca Raton, CRC Press: Taylor & Francis Group, - [citado em 2017-02-04]. Disponível em: https://books.google.pt/books/about/Biohydrogen_Production.html?id=p53AAgAAQBAJ&redir_esc=y.

Das, D., Khanna, N., Veziroğlu, T.N. (2008) Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 14 (2): 57 - 67

Das, D., Veziroğlu, T.N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26: 13 - 28

De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletini, A. (2014) Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39: 20930 - 20941

Demirbas, A. (2008) Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49: 2106 - 2116

EUROSTAT (2018) <http://ec.europa.eu/eurostat>, acessado em 1 de Março de 2018

Fan, Y-T., Zhang, Y-H., Zhang, S-F., Hou, H-W., Ren, B-Z. (2006) Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 97: 500 - 505

Fonseca, M.M. & Teixeira, J.A. (coord.) (2007) *Reactores biológicos: Fundamentos e Aplicações* (1ª ed.). Lisboa: LIDEL. (ISBN 978-972-757-366-0)

- Garcia, J-L., Patel, P.K.C., Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6: 205 - 226
- Gerardi, M.H. (2003) *Livro The Microbiology Of Anaerobic Digesters*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. (ISBN 0-471-20693-8)
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G. (2015a) A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144: 73 - 95
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P.N.L., Esposito, G., Pirozzi, F. (2015b) Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *Journal of Environmental Management*, 152: 43 - 48
- Ghimire, A., Luongo, V., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P.N.L., Esposito, G. (2017) Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42: 4861 - 4869
- Guo, M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J-P. (2010) Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 10660- 10673
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggar, M.H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B. (2010) Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 81 - 92
- Hernández, M., Rodríguez, M. (2013) Hydrogen production by anaerobic digestion of pig manure: Effect of operating conditions. *Renewable Energy*, 53: 187 - 192
- Holladay, L.D., Hu, J., King, D.L., Wang, Y. (2009) An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, 139: 244 - 260
- Kaparaju, P., Rintala, J. (2005) Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources, Conservation and Recycling*, 43: 175 - 188
- Khanna, N., Kotay, S.M., Gilbert, J.J., Das, D. (2011) Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *J. Biotechnol*, 152: 9 - 15
- Kim, D-H, Kim S-H., Han, S-K., Shin, H-S. (2006a) Performance of pilot-scale H₂ fermenter: C/N ratio effect and alkaline shock treatment. *Journal of Environmental Engineering and Management*, 16: 327 - 331
- Kim, S-H., Han, S-K., Shin, H-S. (2006b) Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41: 199 - 207
- Kongklian, P., Kongjan, P., O-Thong, S. (2015) Hydrogen and methane production from starch processing wastewater by thermophilic two-stage anaerobic digestion. *Energy Procedia*, 79: 827 - 832
- Kotay, S.M., Das, D. (2008) Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 258 - 263
- Krupp, M., Widmann, R. (2009) Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 4509 - 4516

- Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Bodiroza, B., Amon, T. (2009) Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass and Bioenergy*, 33: 620 - 627
- Lapa, N., Surra, E., Esteves, I. A. A. C., Ribeiro, R. P. P. L., Mota, J. P. B. (2017) *Production of Biogas and BioH₂ – Biochemical Methods*. In *Biofuels Production and Processing Technology*, Chapter 15, M.R. Riazi and D. Chiaramonti (ed.), CRC Press - Taylor & Francis Group, USA, pp. 415-460. (ISBN 9781498778930)
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 173 - 185
- Li, C. & Fang, H.H.P. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37: 1 - 39, DOI: 10.1080/10643380600729071
- Li, D. & Chen, H. (2007) Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 1742 - 1748
- Liang, S., McDonald, A.G. (2015) Anaerobic digestion of pre-fermented potato peel wastes for methane production. *Waste Management*, 46: 197 - 200
- Lin, C-Y., Chang, C-C., Hung, C-H. (2008) Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2445 - 2453
- Lin, C-Y., Lay, C.H. (2004) Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 41 - 45
- Lin, C-Y., Leu, H-J., Lee, K-H. (2016) Hydrogen production from beverage wastewater via dark fermentation and room-temperature methane reforming. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 21736 - 21746
- Liu, C-M., Wu, S-Y. (2016) From biomass waste to biofuels and biomaterial building blocks. *Renewable Energy*, 96: 1056 - 1062
- Liu, C-M., Zheng, J-L., Wu, S-Y., Chu, C-Y. (2016) Fermentative hydrogen production potential from washing wastewater of beverage production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 4466 - 4473
- Louis, P., Flint, H. (2009) Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294: 1 - 8
- Manish, S., Banerjee, R. (2008) Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 279- 286
- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Annuar, M.S.M., Ghafari, S., Vikineswary, S., Zinatizadeh, A.A. (2012) Influences of environmental and operational factors on dark fermentative hydrogen production: A Review. *Clean – Soil, Air, Water*, 40: 1297 - 1305
- Mohan, D., Pittman, C.U., Steele, P.H. (2006) Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. *Energy & Fuels*, 20: 848 - 889
- Mohanakrishna, G., Subhash, G. V., Mohan, S. V. (2011) Adaptation of biohydrogen producing reactor to higher substrate load: Redox controlled process integration strategy to overcome limitations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 8943 - 8952

Morrison, R. & Boyd, R. (2005) *Química Orgânica* (14ª ed.). Lisboa: FUNDAÇÃO CALOUST GULBENKIAN. (ISBN 972-31-0513-6)

Mota, V.T., Júnior, A.D.N.F., Trably, E., Zaiat, M. (2018) Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water research*, 128: 350 - 361

Nayak, B., De J. Berrios, J., Tang, J. (2014) Impact of food processing on the glycemic index (GI) of potato products. *Food Research International*, 56: 35 - 46

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. (2006) An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, 87: 461 - 472

O-Thong, S., Prasertsana, P., Intrasungkhab, N., Dhamwichukorn, S., Birkeland, N-K. (2007) Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 583 - 590

O-Thong, S., Prasertsana, P., Intrasungkhab, N., Dhamwichukorn, S., Birkeland, N-K. (2008) Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1221 - 1321

Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E. (2017) Dark-fermentative pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198: 77 - 87

Parawira, S., Murto, M., Zvaunya, R., Mattiasson, B. (2004) Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar. *Renewable Energy*, 29: 1811 - 1823

Paudel, S., Kang, Y., Yoo, Y-S., Seo, G.T. (2017) Effect of volumetric organic loading rate (OLR) on H₂ and CH₄ production by two-stage anaerobic co-digestion of food waste and brown water. *Waste Management*, 61: 484 - 493

PORDATA (2018) <http://pordata.pt>, accessed a 4 de Março de 2018

Puyuelo, B., Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A. (2011) Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. *Chemosphere*, 85: 653 - 659

Radjaram, B., Saravanane, R. (2011) Assessment of optimum dilution ratio for biohydrogen production by anaerobic co-digestion of press mud with sewage and water. *Bioresource Technology*, 102: 2773 - 2780

Rahman, S.N.A., Masdar, M.S., Rosli, M.I., Majlan, E.H., Husaini, T., Kamarudin, S.K., Daud, W.R.W. (2016) Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66: 137 - 162

Ren, N., Guo, W., Liu, B., Cao, G., Ding, J. (2011) Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 365 - 370

Rughoonundun, H., Mohee, R., Holtzapfel, M. T. (2012) Influence of carbon-to-nitrogen ratio on the mixed-acid fermentation of wastewater sludge and pretreated bagasse. *Bioresource Technology*, 112: 91 - 97

Salem, A., Brunstermann, R., Mietzel, T. (2018) Effect of pre-treatment and hydraulic retentiontime on biohydrogen production from organicwastes. Internaytional Journal of Hydrogen Energy, 1 - 10

Santo, J.D.N. (2013) *Efeito de Pré-tratamentos Térmicos, à Pressão Atmosférica, na Digestão Anaeróbia Mesófila e Termófila de Resíduos de Casca de Batata*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Santos, S.C., Rosa, P.R.F., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., Silva, E.L. (2014) Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. Bioresource Technology, 159: 55 - 63

Silva-Illanes, F., Tapias-Venegas, E., Schiappacasse, M.C., Trably, E., Ruiz-Fillipi, G. (2017) Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. Energy, 141: 358 - 367

Sinha, P., Gaurav, K., Roy, S., Balachandar, G. (2016) Improvement of biohydrogen production with novel augmentation strategy using different organic residues. International Journal of Hydrogen Energy, 41: 14015 - 14025

Smith, A. D., Holtzapple, M. T. (2011) Investigation of the optimal carbon-nitrogen ratio and carbohydrate-nutrient blend for mixed-acid batch fermentations. Bioresource Technology, 102: 5976 - 5987

Tawfik, A. & El-Qelish, M. (2012) Continuous hydrogen production from co-digestion of municipal food waste and kitchen wastewater in mesophilic anaerobic baffled reactor. Bioresource Technology, 114: 270 - 274

Tawfik, A. & Salem, A. (2012) The effect of organic loading rate on bio-hydrogen production from pre-treated rice straw waste via mesophilic up-flow anaerobic reactor. Bioresource Technology, 107: 186 - 190

Trchounian, K., Sawers, R.G., Trchounian, A. (2017) Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: Novel data and future approches. Renewable and Sustainable Reviews, 80: 1201 - 1216

Urbaniec, K., Bakker, R.R. (2015) Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. International Journal of Hydrogen Energy, 40: 3648 - 3658

Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., Poggi-Varaldo, H.M. (2005) Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. International Journal of Hydrogen Energy, 30: 1383 - 1391

Wang, J., Wan, W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy, 34: 799 - 811

Wang, S., Zhang, T., Su, H. (2016) Enhanced hydrogen production from corn starch waste water as nitrogen source by mixed cultures. Renewable Energy, 96: 1135 - 1141

Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. (2008) Review: Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresource Technology, 99: 7928 - 7940

Won, S.G., Lau, A.K. (2011) Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 102: 6876 - 6883

Xiao, L., Deng, Z., Fung, K.Y., Ng, K.M. (2013) Biohydrogen from anaerobic digestion of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 13907 - 13913

Yasin, N.H.M., Mumtaz, T., Hassan, M.A. (2013) Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 130: 375 - 385

Zhu, H., Stadnyk, A., Béland, M., Seto, P. (2008) Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 99: 5078 - 5084

Zieliński, M., Korzeniewska, E., Filipowska, Z., Debowski, M., Harnisz, M., Kwiatkowski, F. (2017) Biohydrogen production at low load of organic matter by psychrophilic bacteria. *Energy*, 1034: 1132 - 1139